

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Vérification de l'expression différentielle de gènes identifiés après differential display comparant l'expression génique lors de la sénescence rélicative et de la sénescence rélicative induite prématurément par les stress

Chrétien, Aline

Award date:
2002

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

Vérification de l'expression différentielle de gènes identifiés après "differential display" comparant l'expression génique lors de la sénescence répllicative et de la sénescence répllicative induite prématurément par les stress

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Aline CHRETIEN

Juin 2002

V75 20045915

Vérification de l'expression différentielle de gènes identifiés après différentielle display comparant l'expression génique de la sénescence répllicative et la sénescence induite prématurément par les stress

CHRETIEN Aline

Résumé

La technique de "differential display" a été utilisée antérieurement afin de comparer simultanément le niveau d'expression de multiples transcrits, chez des fibroblastes en sénescence induite prématurément par les stress subcytotoxiques (SIPS) par le *tert*-butylhydroperoxyde ou par l'éthanol, et chez des fibroblastes sénescents. Cette technique générant une proportion non négligeable de faux-positifs, il est nécessaire de vérifier ces variations du niveau de transcrits par une technique alternative.

Dans un premier temps, nous avons identifié les gènes dont la différence d'expression par rapport aux cellules jeunes était commune à la sénescence répllicative et / ou aux deux types de SIPS. Ensuite, en utilisant la technique de la PCR en temps réel, nous avons confirmé cette variation d'expression pour 7 gènes identifiés, et montré que d'autres étaient des faux-positifs de "differential display".

Le niveau d'expression protéique de deux de ces gènes a pu être étudié par western-blot. Ce travail ouvre la voie à l'étude de la fonction de ces 5 gènes dans la réponse cellulaire aux stress et, plus précisément, dans l'établissement de traits marquants de la sénescence cellulaire après exposition à des stress subcytotoxiques, dont le blocage du cycle cellulaire et une résistance accrue aux stimuli pro-apoptotiques.

Remerciements

C'est avec un regard nostalgique que je me retourne sur ces quatre années d'études. Au terme de ce travail, je voudrais exprimer ma reconnaissance envers toutes les personnes qui m'ont soutenu et qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de ce mémoire.

Tou d'abord, je vous remercie Madame le Professeur Martine Raes, de m'avoir accueilli dans votre laboratoire. Votre dynamisme et votre rigueur ont stimulé mon travail. Mais aussi vous, Monsieur le Professeur José Remacle pour vos petits mots d'encouragements.

Merci à toi, Olivier, pour ton accueil chaleureux, ta simplicité et tes paroles rassurantes. Travailler avec toi est un réel plaisir. Tes encouragements m'ont toujours rassuré lorsque le moral n'y était pas. Les trois nouvelles petites grasses ont toujours su qu'elles pouvaient compter sur toi.

Thierry, alias "Gaumix", tu as fait preuve d'une grande patience face aux deux "caractères" avec lesquels tu as travaillé durant ces quelques mois. Cela n'a pas toujours été "easy", mais tu as résisté sans doute grâce à ta compréhension gaumaise!

Jean-Jean, ah! David Copperfield., grâce à toi, j'ai découverts les stress (cellulaires...), le chocolat Galler, et la "magie de la science". Un gigantesque MERCI, surtout lors des derniers moments où tu as été notre "tuteur à tous".!

Friedel, c'est grâce à toi, que j'ai fait mes premiers débuts en western-blot, on peut toujours compter sur ton aide et tes conseils. Il faudra que tu m'explique comment tu fais pour être toujours d'aussi bonne humeur!

Merci à l'équipe des "Gras" toute entière, l'ambiance et l'esprit d'équipe qu'il y règne sont exceptionnelles.

C'est ici que nous entrons dans "la cage des mémorants".

Vous, les deux grasses avec qui j'ai créé des liens solides lors de ce travail, Fofie et Céline, merci pour l'entraide, le réconfort lors des moments difficiles, les moments de délires, les moments "pose-chocolat" (avec Sophie) ou "pose-bonbons" (avec Céline), pour la complicité que l'on a échangé et que l'on échangera encore, je l'espère...

Sophie, sans toi, ta franchise, tes conseils (à tous propos...), ta compréhension, le mémoire n'aurait pas été ce qu'il a été. Vive les coups-foireux dans lesquels on plonge à deux pieds joints!!!

Céline, ta façon d'aller droit au but, ainsi que ta gentillesse m'ont fait du bien tout au cours du mémoire.

Merci à toi, Marie, pour ces quatre années passées ensemble. Tu es quelqu'un d'exceptionnel, avec de grandes valeurs. J'ai toujours pu compter sur toi. Ta force de caractère et ta vivacité, même dans les moments les plus durs, ont été une motivation pour moi. Merci pour ton humour et ton amitié, qui je l'espère, resteront toujours...

Valéry, merci pour ton soutien moral et tes crêpes-vanille-chocolat-banane, pendant ces moments parfois difficiles. Merci aussi pour l'amitié qui s'est installée pendant le mémoire...J'ai toujours pu compter sur toi!

Merci à Christelle (le bidelle!!), Ludo et Sébastien pour votre humour décapant, et tous les autres avec qui j'ai partagé cette "cage" durant 3 mois...

Et aussi merci aux URBMiens (Allan avec ses 2 ailes..., ect.) et les URBOs avec qui on a passé de bonnes guindailles (ainsi que ceux qui n'y étaient jamais, n'est-ce pas David?!).

Comment ne pas parler du bureau des "Fratello"? L'ambiance du labo ne serait pas pareil sans vous!

Merci P'ti p'ti p'ti frère, "Chi-Chi", pour ton humour et tes p'tites manies qui m'ont toujours fait rire!

Merci Anne-France, pour ton réconfort, ton aide (hé oui, tu as aussi l'esprit "Gras"!), tes petites promenades du temps de midi, et tes remontants au chocolat.

Gaëtan, pour ta bonne humeur et Sophie pour tes encouragements.

Denis, je voudrais vraiment te remercier pour tout ce que tu m'as apporté. Je suis très contente de t'avoir mieux connu. Derrière les airs de durs que tu te donnes, tu es quelqu'un "d'assez relevé"! Merci pour le "piquant"! Merci pour m'avoir écouté, réconforté, donné confiance en moi, et merci pour ton humour digne des "Fratello". Au fait, "t'as changé, toi?!...Heuuu...!!

Merci à Marc (je ne suis pas blonde!), à Edouard, à tous les chercheurs de l'URBC.

Merci aussi aux copines de "Biomont", surtout toi, "Bibiche", pour ton soutien, et ton courrier remonte-moral unique lors de ces quatre années.

Merci à toi, Stéphane (Plage) pour ta présence, ton soutien, ton aide, ta patience (et quelle patience!), ta compréhension et tes encouragements...Tu as l'art de rendre les choses simples quand je les rends compliquées. Je pourrai continuer encore et encore... mais je vais m'arrêter là!

Je ne pourrais terminer cette longue longue liste sans vous remercier, vous, mes parents, qui m'avez toujours encouragé, et avez fait preuve d'une énorme patience et compréhension durant ces quatres années. C'est en pensant à vous et en vous entendant me répéter que je suis "la meilleure" que j'ai toujours voulu me battre! Je ne vous remercierai jamais assez... Et merci aussi à toi, Fred.

Table des matières

<u>I. INTRODUCTION</u>	1
<i>I.1. Sénescence réplivative</i>	1
<i>I.1.1. Définition</i>	1
<i>I.1.2. Historique</i>	1
<i>I.1.3. Les biomarqueurs de la sénescence</i>	2
I.1.3.a. Morphologie cellulaire	2
I.1.3.b. L'activité β -galactosidase associée à la sénescence	2
I.1.3.c. Le raccourcissement des télomères	3
I.1.3.d. L'altération du génome mitochondrial	4
I.1.3.e. La synthèse protéique et la réplication de l'ADN	4
I.1.3.f. Régulation du cycle cellulaire	5
I.1.3.f.a Répression de gènes de réponse précoce aux mitogènes	5
I.1.3.f.b Répression de gènes de la phase G ₁ /S	6
I.1.3.f.c Expression d'inhibiteur de kinases dépendantes de cyclines	6
<i>I.2. Sénescence induite prématurément par les stress</i>	7
<i>I.3. Comparaison transcriptomique de la SIPS et de la sénescence réplivative</i>	10
I.3.1. L'hybridation soustractive	10
I.3.2. L'analyse différentielle représentative (RDA)	10
I.3.3. La technique de SAGE (Serial Analysis Gene Expression)	11
I.3.4. Le differential display	12
I.3.5. Les micro-damiers à ADN	14
I.3.6. Le Northern blotting	14
I.3.7. RNase Protection assay	15
I.3.8. RT-PCR semi quantitative	15
I.3.9. Real-Time PCR	16
<u>II. BUT DU MÉMOIRE</u>	18
<u>III. MATÉRIELS ET MÉTHODES</u>	19
<i>III.1. Clonage des fragments d'ADNc</i>	19
III.1.1. Récupération des fragments d'ADNc	19
III.1.2. Amplification des fragments d'ADNc d'intérêt	19

III.1.2.a. Préparation du mélange réactionnel	20
III.1.2.b. Programmation des cycles PCR.....	20
III.1.3. <i>Electrophorèse en gel d'agarose</i>	21
III.1.4. <i>Purification de l'ADN amplifié</i>	22
III.1.5. <i>Plasmides</i>	23
III.1.6. <i>Ligation insert-plasmide</i>	24
III.2. Culture bactérienne.....	25
III.2.1. <i>Préparation des milieux de culture</i>	25
III.2.2. <i>Souche bactérienne</i>	26
III.2.3. <i>Culture des bactéries E.Coli Sure</i>	26
III.2.4. <i>Préparation de bactéries compétentes</i>	26
III.2.5. <i>Transformation bactérienne par choc thermique</i>	27
III.2.6. <i>Minicultures :</i>	28
III.3. Identification des fragments d'intérêt	28
III.3.1. <i>Criblage par PCR</i>	28
III.3.1.a. Préparation du mélange réactionnel	28
III.3.1.b. Conditions des cycles PCR.....	29
III.3.1.c. Visualisation sur gel d'agarose	29
III.3.2. <i>Minipréparation d'ADN plasmidique</i>	29
III.3.3. <i>Le séquençage</i>	31
III.4. Culture de fibroblastes WI-38	31
III.4.1. <i>Culture des fibroblastes WI-38 :</i>	31
III.4.1.a. Repiquage des fibroblastes WI-38 :	32
III.4.1.b. Congélation des fibroblastes WI-38 :	32
III.4.1.c. Décongélation des fibroblastes WI-38 :	33
III.4.2. <i>Stress successifs:</i>	33
III.5. Détection des biomarqueurs de la sénescence	34
III.5.1. <i>Activité SA-β-gal</i>	34
III.5.2. <i>Incorporation de la [3H]-thymidine</i>	35
III.6. Quantification relative du taux de transcrits.....	37
III.6.1. <i>Préparation de l'ARN</i>	37
III.6.1.a. <i>Extraction d'ARN</i>	37
III.6.1.b. <i>Dosage de l'ARN</i>	38

III.6.2. PCR en temps réel.....	38
III.6.3. Transcription inverse.....	39
III.6.3.a. PCR en temps réel :.....	40
III.7. Quantification relative du taux de protéines	42
III.7.1. Préparation des extraits protéiques.....	42
III.7.1.a. Extraction protéique	42
III.7.1.b. Méthode inverse :.....	43
III.7.2. Western blot.....	44
<u>IV. RÉSULTATS</u>	48
IV.1. Séquençage.....	48
IV.1.1. PCR de réamplification:.....	48
IV.1.2. Clonage et séquençage des bandes d'intérêt:.....	49
IV.1.3. Brève description des gènes candidats retenus (tableau IV.2).....	50
IV.2. Vérification de l'expression différentielle des gènes candidats retenus.....	53
IV.2.1. Culture cellulaire :.....	53
IV.2.1.a. Cellules positives pour l'activité SA β -gal.....	54
IV.2.1.b. Estimation du potentiel prolifératif par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée.....	55
IV.2.2. Vérification du niveau d'expression différentiel au niveau de l'ARNm:.....	55
IV.2.2.a. Quantification du taux de transcrits dans les différentes conditions cellulaires :	56
IV.2.3. Détermination du niveau d'expression protéique :	59
<u>V. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</u>	61
<u>VI. BIBLIOGRAPHIE</u>	66

Liste des Abréviations

Préfixes

c	Centi- (10^{-2})
m	Milli- (10^{-3})
μ	Micro- (10^{-6})
n	Nano- (10^{-9})
p	Pico- (10^{-12})
f	Femto- (10^{-15})

Unités

A	Ampère
°C	Degré Celsius
Ci	Curie
Da	Dalton
g	Gramme
g	Unité de gravité
h	Heure
l	Litre
m	Mètre
M	Molaire
min	Minute
mol	Mole
rpm	Tours par minute
sec	Seconde
U	Unité enzymatique
V	Volt

Autres

A	Adénine
aa	Acide aminé
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADNc	Acide Désoxyribonucléique complémentaire
ADNmt	Acide Désoxyribonucléique mitochondrial
AOP2	<i>Antioxydant Protein 2</i>
Apo J	Apolipoprotéine J
ApoL	Apolipoprotéine L
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	Acide Ribonucléique messenger
ATP	Adénosine Triphosphate
AUP-1	<i>Ancient Ubiquitous Protein 1</i>
β -gal	Activité β -galactosidase
BIRC-6	<i>Baculoviral IAP repeat-containing protein 6</i>
bp	<i>base pairs</i> ; paires de bases
C	Cytosine
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinase</i> ; Kinase Dépendante de Cycline
CMV	Cytomégalo virus
CPD	<i>Cumulative Population Doublings</i> ; Doublements Cumulatifs de Population
CRP2	Protéine de progression du cycle cellulaire 2
CPT I	Carnitine Palmitoyl Transférase I
CPT II	Carnitine Palmitoyl Transférase II
CRAT	Carnitine Acétyl Transférase
CROT	Carnitine Octanoyl Transférase
Ct	<i>Threshold Cycle</i> ; Cycle seuil
Δ Ct	Ct du gène d'intérêt - Ct du gène de référence
$\Delta\Delta$ Ct	Δ Ct dans la situation test - Δ Ct dans la situation de référence
DD RT-PCR	<i>Differential Display</i> basé sur la RT-PCR
ddH ₂ O	Eau bi-distillée
DHFR	Dihydrofolate Reductase
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DNAse	Désoxyribonucléase
dNTP	Déoxynucléotide triphosphate
DO	Densité Optique
DTT	Dithiotréitol

EDTA	Ethylène Diamine Tétra-Acétique
ERK	Extracellular Regulated Kinase
EtOH	éthanol
G	Guanine
G418	Généticine
G6PD	Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase
gel 2D	Gel d'électrophorèse bidimensionnelle
³ H	Tritium
HBP	<i>Highly Basic Protein</i>
HBS	<i>Hepes Buffer Saline</i>
HDFs	<i>Human Diploid Fibroblasts</i> ; Fibroblastes Humains Diploïdes
HMG	<i>High Mobility Group</i>
HSP27	<i>Heat Shock Protein 27</i>
IAP	<i>Inhibitor of Apoptosis</i>
IGFII	Insulin-Like Growth Factor II
IGFII-R	Insulin-Like Growth Factor II Receptor
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactoside
j0	Cellules jeunes, avant le premier stress
kb	kilo paires de bases
LB	Milieu de culture de Luria-Bertani
M-6P	Mannose-6 phosphate
MEM	<i>Minimal Eagle Medium</i> ; Milieu de culture minimal d'Eagle
MI à III	Morphotypes mitotiques de type I à III
MOPS	Acide 3-(N-morpholino)-propanesulfonique
NADH	Forme réduite de la Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NTC	<i>No Template Control</i> ; Blanc de PCR
oligo dT	Oligonucléotide contenant une répétition de thymines
³² P	Isotope 32 du phosphore
³³ P	Isotope 33 du phosphore
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> ; Réaction de Polymérisation en Chaîne
pH	potentiel hydrogène
PKM2	Pyruvate Kinase (Isoforme 2, ou du Muscle)
PM IV à VII	Morphotypes post-mitotiques de type IV à VII
pRb	Protéine de rétinoblastome
PVDF	<i>Polyvinyl difluoride</i>
RDA	<i>Representative Differential Analysis</i> ; Analyse Différentielle Représentative
RL	<i>Radicaux Libres</i>
RMP	Récepteur au Mannose-6 Phosphate
RNAse	Ribonucléase
RNAsin	Inhibiteur de ribonucléases
RPN2	Ribophorine 2
RT-PCR	Rétro-transcription suivie d'une PCR
³⁵ S	Isotope 35 du soufre
S100A13	Protéine de liaison au calcium S100A13
S.A β-gal	Activité β-galactosidase associée à la sénescence
SAGE	<i>Serial Analysis Gene Expression</i> ; Analyse Sériée de l'Expression Génique
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SIPS	Sénescence Induite Prématûrément par les Stress
SM22	<i>Smooth Muscle 22</i>
SOC	Milieu de culture
SR	Sénescence Répllicative
SRE	<i>Serum Responsive Element</i> ; Élément de Réponse au Sérum
SRF	<i>Serum Responsive Factor</i> ; Facteur de Réponse au Sérum
SV40	Fibroblastes WI-38 immortalisés par l'antigène T du virus SV40
T	Thymine
T25	Boîte de culture de 25 cm ²
T75	Boîte de culture de 75 cm ²
TBE	Tampon Tris-Borate EDTA
t-BHP	<i>tert</i> -butyl hydroperoxyde
TBS	<i>Tris Buffer Saline</i>
TBS-T	<i>Tris Buffer Saline-Tween</i>
TE	Tampon Tris-EDTA
TGF-β1	Transforming Growth Factor β1
U.V.	Ultraviolets
X-gal	5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranoside

Introduction

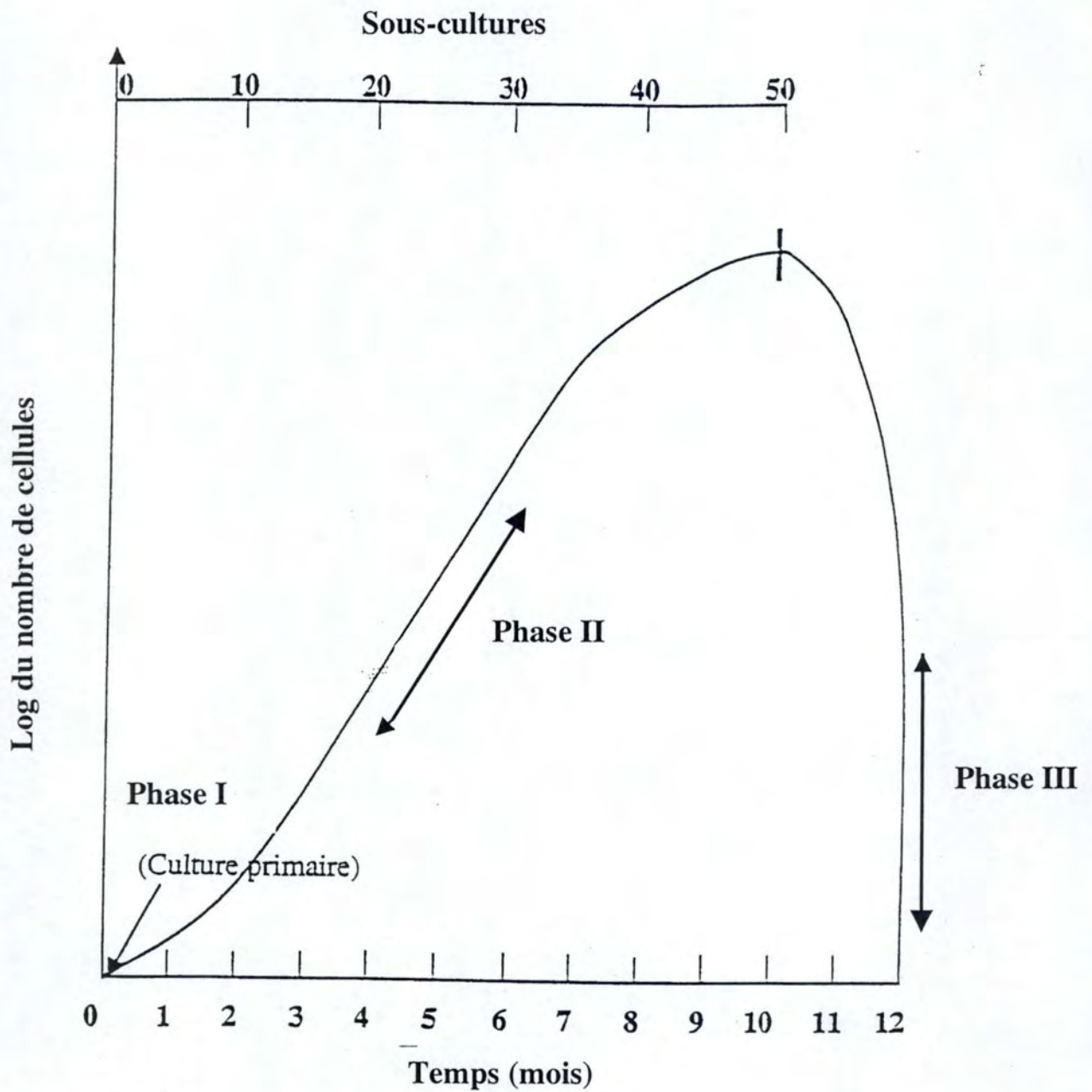


Figure I.1 : Diagramme montrant les trois phases successives de la vie d'une culture de fibroblastes normaux (Hayflick, 1977). La mise en culture se caractérise par la mise en culture d'un explant, la migration des cellules vers l'extérieur et l'établissement d'une première population de cellules. La phase II débute dès le premier repiquage et se caractérise par un taux de croissance exponentielle. Un ralentissement du rythme de croissance survient ensuite, suivi par un arrêt définitif des divisions cellulaires. Cet état de sénescence répliquative se termine, après une période plus ou moins longue, par la mort des cellules (Phase III).

I. Introduction

I.1. Sénescence répllicative

I.1.1. Définition

La sénescence répllicative se caractérise par un arrêt définitif des divisions cellulaires après l'épuisement de leur potentiel prolifératif en culture. Les cellules arrêtent de se diviser de manière irréversible mais restent métaboliquement actives jusqu'à plusieurs mois, voir plusieurs années, avant de mourir par nécrose (Hayflick *et al.*, 1961).

I.1.2. Historique

En 1912, Alexis Carrel a réalisé la première « culture cellulaire ». Il parvint à maintenir en culture des cellules de cœur de poulet pendant 35 ans, de 1911 à 1946, durée de temps nettement supérieure à la durée de vie du poulet. Il suggéra donc que les cellules sont immortelles et se divisent de manière infinie, une fois retirées de l'organisme (Carrel, 1912). Cependant les milieux de culture constitués d'extraits d'embryons contenaient des cellules vivantes. Ainsi, à chaque renouvellement de milieu, l'expérimentateur introduisait de nouvelles cellules dans la culture. En 1916, Peyton Rous introduisit la culture en monocouche de cellules ainsi que l'utilisation de la trypsine pour détacher ces dernières (pour une revue (Hayflick, 1977)). En 1961, L. Hayflick et P. Moorhead montrèrent que des fibroblastes de poumon fœtal humain sont mortels. En effet, ils se divisent un nombre limité de fois, correspondant à environ 50 passages en culture. Ils caractérisèrent l'évolution du potentiel prolifératif suivant 3 phases (figure I.1). La phase I correspond à la mise en culture à partir du milieu d'origine.

La phase II, qui débute lorsque les cellules se sont répliquées pour la première fois, est caractérisée par une prolifération rapide et exponentielle des cellules.

Et enfin la phase III, pendant laquelle la vitesse de croissance décroît progressivement jusqu'à l'arrêt total de toute division cellulaire. C'est ce qu'on a appelé plus tard la sénescence répllicative ou « limite de Hayflick ».

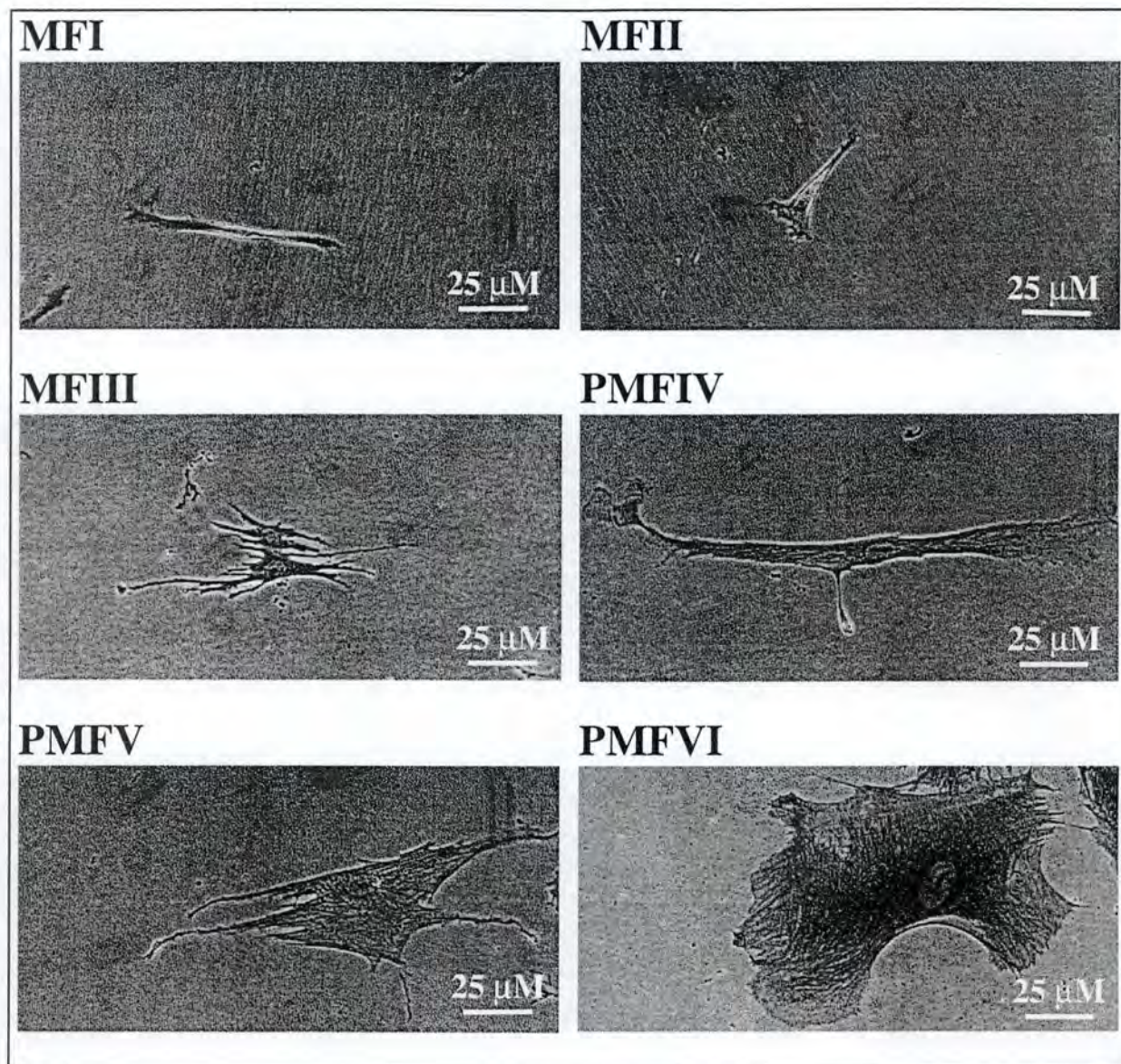


Figure I.2 : Photographies représentant les différents morphotypes tels qu'ils sont observés dans les cultures de fibroblastes humains WI-38. Les fibroblastes humains évoluent au cours de leur vieillissement à travers une séquence de sept morphotypes dont les trois premiers (MFI, MFII, MFIII) sont des cellules mitotiques et les quatre suivants (PMFIV, PMFV, PMFVI) des cellules post-mitotiques. Le PMFVII n'est pas représenté compte tenu de sa rareté dans des cultures de HDFs. Contrairement aux autres morphotypes qui sont relativement stables, le PMFVII a une durée de vie de quelques jours. Il représente le dernier stade du vieillissement avant la mort cellulaire.

Ce modèle fut par la suite généralisé à de nombreux types cellulaires prolifératifs, ainsi qu'à de nombreuses espèces animales.

Cette évolution des cellules s'accompagne de modifications apparaissant progressivement au cours des passages en culture. Ces modifications sont les biomarqueurs de la sénescence, la description qui en est faite ici concerne principalement les fibroblastes.

I.1.3. Les biomarqueurs de la sénescence

I.1.3.a. Morphologie cellulaire

Bayreuther et ses collaborateurs ont montré qu'il était possible de classer les fibroblastes humains en sept types morphologiques, appelés morphotypes (figure I.2). Les trois premiers sont mitotiques (MI, MII, MIII). Ils se divisent activement.

Les MI sont petits, fusiformes et effilés ; les MII sont petits mais de formes irrégulières ; les MIII, de plus grande taille, irréguliers et de formes assez variées (souvent épithéliales).

Les trois morphotypes suivants sont dits post-mitotiques (ils se retrouvent en majorité dans les cultures de cellules vieilles).

Les PMIV sont de grande taille, avec la forme d'un bâtonnet échancré ; les PMV sont arrondis et de très grande taille ; les PMVI sont semblables aux PMV, mais de taille encore supérieure ; les PMVII correspondent à des PMVI en train de mourir par nécrose.

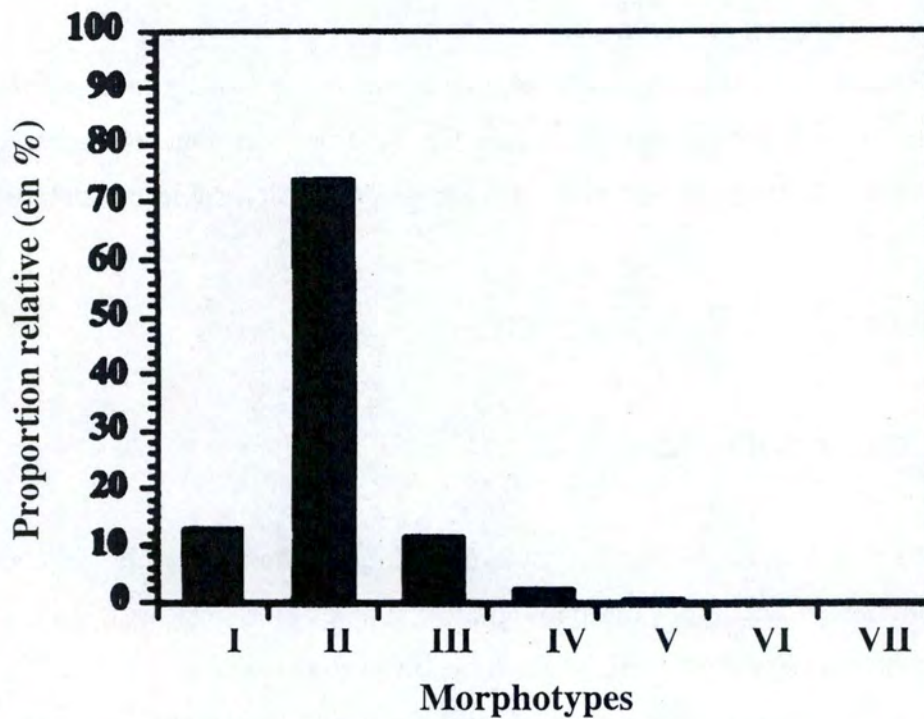
Au cours des passages en culture, ou DCP (Doublements Cumulés de Population), les fibroblastes évoluent en passant par les différents morphotypes successifs (figure I.3).

I.1.3.b. L'activité β -galactosidase associée à la sénescence

La β -galactosidase est une hydrolase lysosomale qui a pour substrat essentiel le lactose, qu'elle clive en galactose et glucose. Son activité est facilement détectable grâce à un substrat artificiel : le 5 bromo-4 chloro-3 indolyl β -D galactopyranosine (X-Gal).

En 1995, le groupe de J. Campisi a mis en évidence une activité β -galactosidase associée à la sénescence (Dimri *et al.*, 1995). A pH 4, les cellules jeunes et vieilles sont colorées en présence de X-gal, substance qui, après sa dégradation par l'enzyme, donne un composé bleu. A pH 6, seules les cellules vieilles se colorent (figure I.4). Pourquoi cette

Fibroblastes à 50% de leur vie proliférative



Fibroblastes à 90% de leur vie proliférative

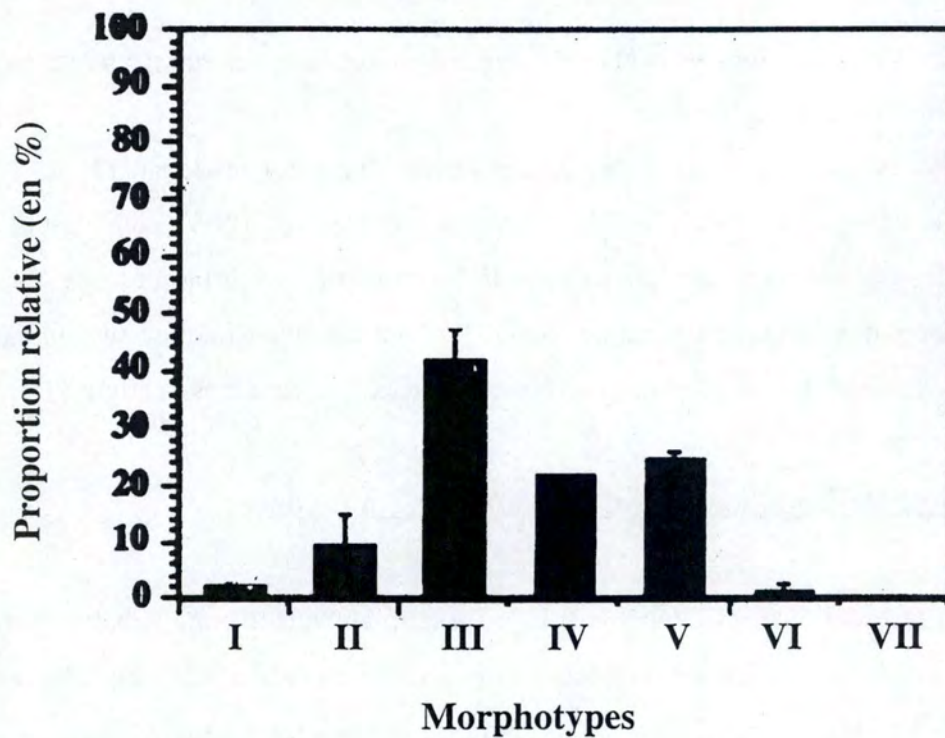


Figure I.3 : Proportion relative (en %) des sept morphotypes à 50% et 90% de la vie proliférative des fibroblastes WI-38.

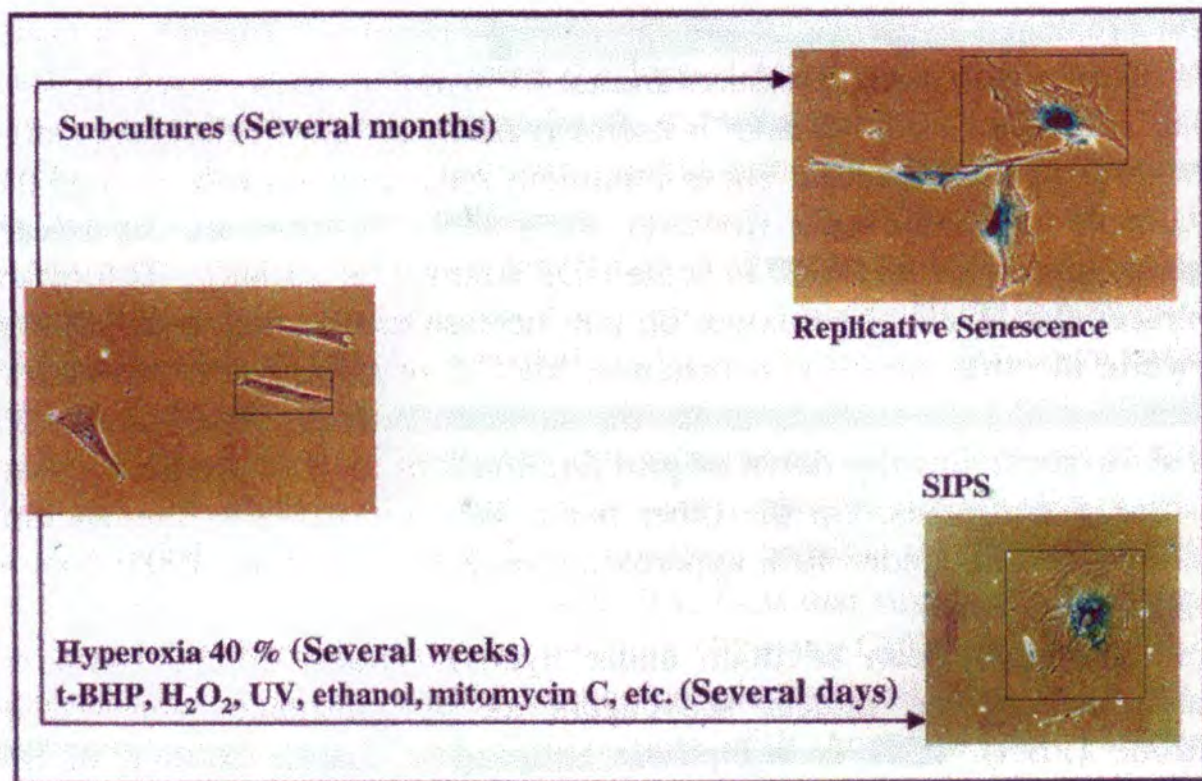


Figure I.4 : Activité β -galactosidase associée à la sénescence. Cette activité est observée chez les fibroblastes diploïdes humains en sénescence réplivative et chez les fibroblastes diploïdes humains en sénescence induite prématurément par les stress (SIPS).

La sénescence réplivative chez les HDFs (fibroblastes diploïdes humains) apparaît après plusieurs mois de sous-cultures, alors que la SIPS apparaît après plusieurs semaines (sous hyperoxie : 40% en oxygène), ou plusieurs jours (lorsqu'elle est induite par des doses subcytotoxiques de H₂O₂, *tert*-butylhydroperoxyde, mitomycine C, UV, ou éthanol). HDFs en SIPS sont aussi positifs pour l'activité β -galactosidase associée à la sénescence (Toussaint, 2000).

A.

Morpho.	HDFs à faible CPDs		HDFs au dernier CPD		HDFs à faible CPDs + 5 stress sous 30µM de t-BHP	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
I	2,0 ± 0,2	0,0 ± 0,0	2,3 ± 0,7	0,0 ± 0,0	0,6 ± 1,0	0,0 ± 0,0
II	86,2 ± 1,3	2,8 ± 0,3	41,3 ± 4,1	20,6 ± 7,8	19,9 ± 3,2	35,3 ± 13,8
III	10,1 ± 1,2	41,3 ± 8,2	46,5 ± 5,6	61,1 ± 15,8	54,5 ± 6,1	54,3 ± 10,1
IV	1,3 ± 0,5	88,7 ± 19,6	7,9 ± 2,1	75,3 ± 6,3	21,2 ± 3,7	79,0 ± 12,1
V	0,5 ± 0,2	83,8 ± 18,9	1,8 ± 1,7	94,4 ± 9,6	2,0 ± 1,5	93,3 ± 11,6

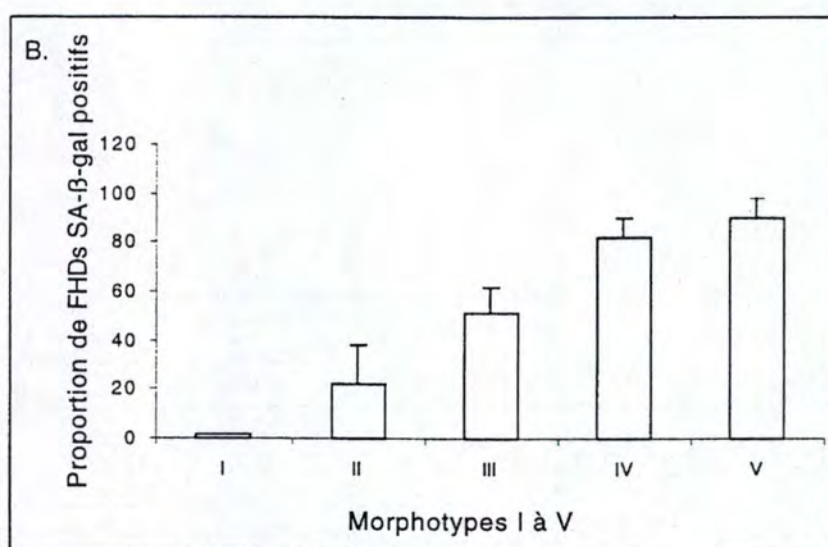


Figure I.5 : A) Relation entre les morphotypes et la SA β-gal chez les HDFs WI-38 jeunes (50% du potentiel prolifératif), sénescents (90% du potentiel prolifératif), ou jeunes soumis à cinq stress successifs sous 30µM de t-BHP (Toussaint, 2000). Les fibroblastes confluents ont été soumis à un stress de une heure par jour, cinq jours de suite. Les résultats sont exprimés comme la valeur moyenne ± écart type du nombre de cellules par morphotype et positive ou non pour l'activité SA β-gal. B) Proportion moyenne de cellules positives pour la SA β-gal pour les morphotypes I à V chez les HDFs WI-38. La proportion moyenne de cellules positives pour la SA β-gal est représentée comme la valeur moyenne ± écart type. Les morphotypes VI et VII ne sont pas représentés car ils représentent moins de 0,025% de la population totale.

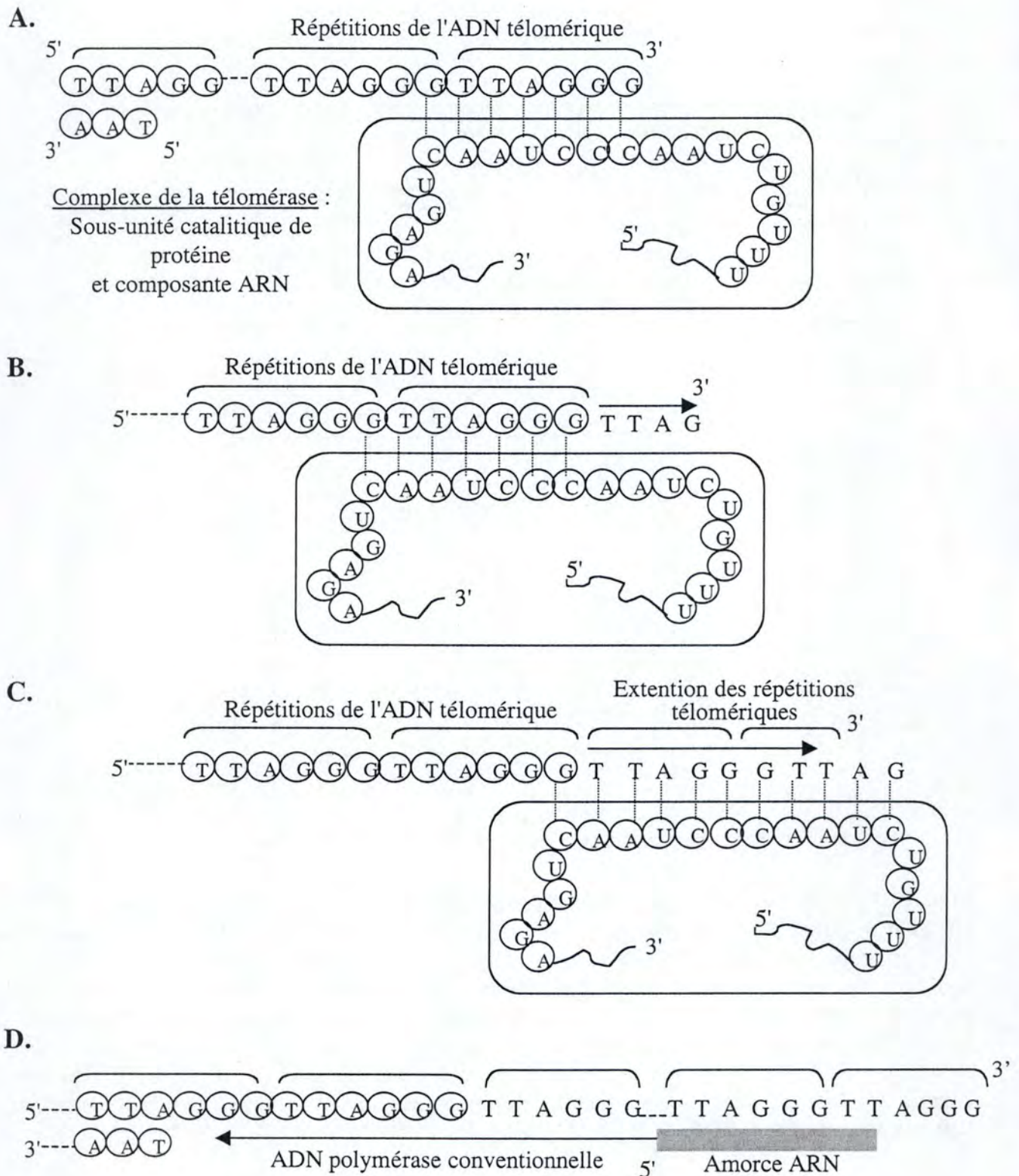


Figure I.6a : Modèle d'élongation des extrémités chromosomiques par la télomérase (Urquidi, 2000). (A) La télomérase s'hybride au télomère à l'extrémité 3' de son ARN au niveau de la structure simple-brin la plus distale. (B) La télomérase catalyse l'extension du brin télomérique riche en G sur toute la longueur de sa molécule d'ARN. (C) L'enzyme se déplace vers l'extrémité et catalyse une nouvelle élongation. Ce processus se répète plusieurs fois résultant en une élongation dans le sens 5' vers 3'. (D) Le brin complémentaire (riche en C) est synthétisé par extension d'une amorce ARN par une ADN polymérase conventionnelle.

différence d'activité? On sait que la taille des lysosomes augmente avec le vieillissement *in vitro* (Remacle *et al.*, 1980). La β -gal pourrait donc s'accumuler et son activité devenir détectable dans une gamme élargie de pH (élargissement du pH optimal). C'est ce que suggère le travail de J. Erusalimski (Kurz *et al.*, 2000). On peut établir une corrélation entre l'augmentation de la proportion de cellules positives pour l'activité β -galactosidase et l'augmentation de la proportion des morphotypes les plus tardifs (Toussaint *et al.*, 2000b) (Toussaint *et al.*, 2000a) (figure I.5).

I.1.3.c. Le raccourcissement des télomères

On peut définir les télomères comme étant des séquences hautement répétées (sur 10-15 Kb) situées à l'extrémité des chromosomes. Chez les mammifères, cette séquence répétée est TTAGGG (Meyne *et al.*, 1989). A chaque duplication de l'ADN par l'ADN-polymérase (figure 6a), celle-ci ne duplique pas les dernières bases des télomères : il y a une perte de 50 à 100 bp par DCP qui varie en fonction des types cellulaires, soit 2500 bp après 50 DCP pour les fibroblastes de poumon foetal (Harley *et al.*, 1990). A la naissance de chaque individu, les télomères sont longs de 10 à 15 Kb chez les fibroblastes, puis se raccourcissent avec l'âge (Allsopp *et al.*, 1992) (Hastie *et al.*, 1990) (Cross *et al.*, 1990) avec une perte de 15 à 50 bp par an, *in vivo* (Harley *et al.*, 1990) (figure I.6b).

Mais comment le raccourcissement des télomères entraîne-t-il l'arrêt du cycle cellulaire ? Un télomère critiquement court induit une réponse de dommage à l'ADN, dépendante de p53, qui conduit à la sénescence répllicative. Lors de l'introduction de l'antigène-T de SV40, une phase de prolifération prolongée a lieu pendant laquelle les télomères continuent à se raccourcir, avec une fréquence accrue d'instabilité chromosomique. Après cette période de vie répllicative allongée, une phase de mortalité survient durant laquelle la plupart des cellules meurent. Les cellules qui survivent à cette phase de mortalité expriment la télomérase (figure I.7) et sont immortelles. La longueur des télomères reste ainsi constante (figure I.8). En effet, à chaque division, la télomérase synthétise un fragment de télomère sur base de la matrice d'ARN (figure I.9). Il est également à noter que la télomérase est aussi exprimée chez les cellules germinales.

Lorsqu'une transfection stable de l'ADNc codant la sous-unité catalytique de la télomérase est réalisée dans des fibroblastes humains normaux, on observe une durée de vie proliférative augmentée, jusqu'au moins 350 divisions cellulaires. Notons que les cellules

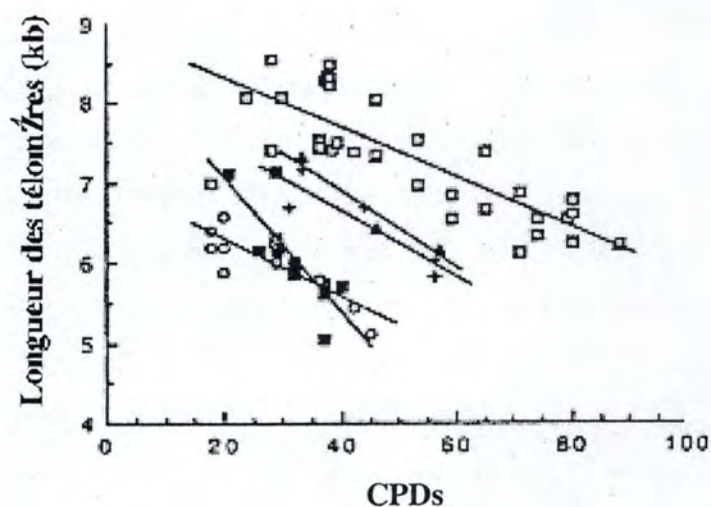
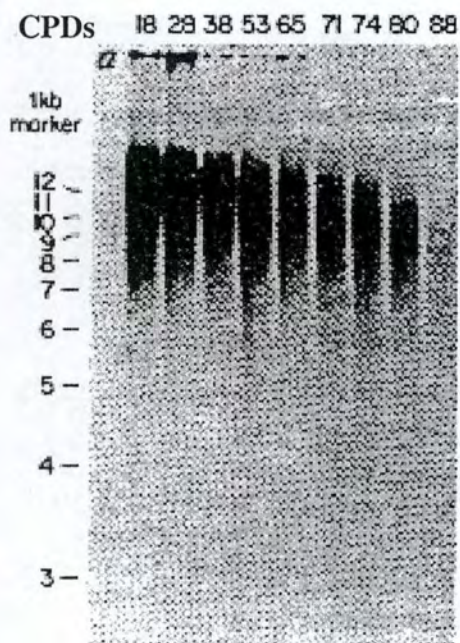


Figure I.6b : Raccourcissement des télomères au cours du vieillissement *in vitro* des fibroblastes humains normaux (Harley, 1990). (A) Autoradiographie de southern blot montrant le raccourcissement des télomères (fragment de restriction terminal (TRF); sonde TTAGGG) chez la souche de fibroblastes humains normaux HSC 172. (B) Quantification du raccourcissement des télomères en fonction du nombre de doublements cumulés de population.

Sénescence

Reprise des divisions cellulaires

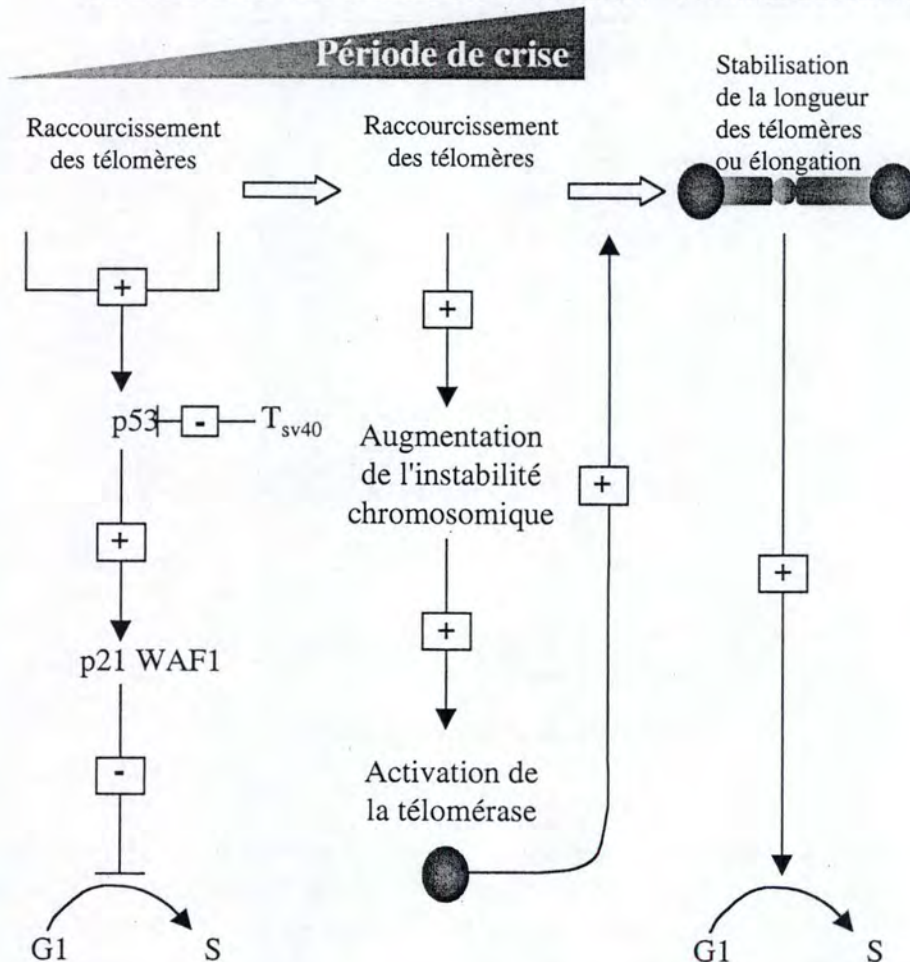
Immortalisation

Début de la crise (M_1)

Fin de la crise (M_2)

Augmentation de la déstabilisation chromosomique

Stabilisation des chromosomes



OFF

Activité de la télomérase

ON

Figure I.7 : Rôle du couple télomère-télomérase dans le processus d'immortalisation (Pommier, 1995). Un télomère critique court induit une réponse de dommage à l'ADN, dépendante de p53 qui conduit à la sénescence répliquative. Avec l'introduction de l'antigène grand T de SV40, une phase de prolifération prolongée a lieu pendant laquelle les télomères continuent à se raccourcir, avec une fréquence accrue d'instabilités chromosomiques. Après cette période de vie répliquative allongée, une phase de mortalité (M_2) survient durant laquelle la plupart des cellules meurent. Les cellules qui émergent de cette phase de mortalité ont activé la télomérase et leurs chromosomes ne se raccourcissent plus.

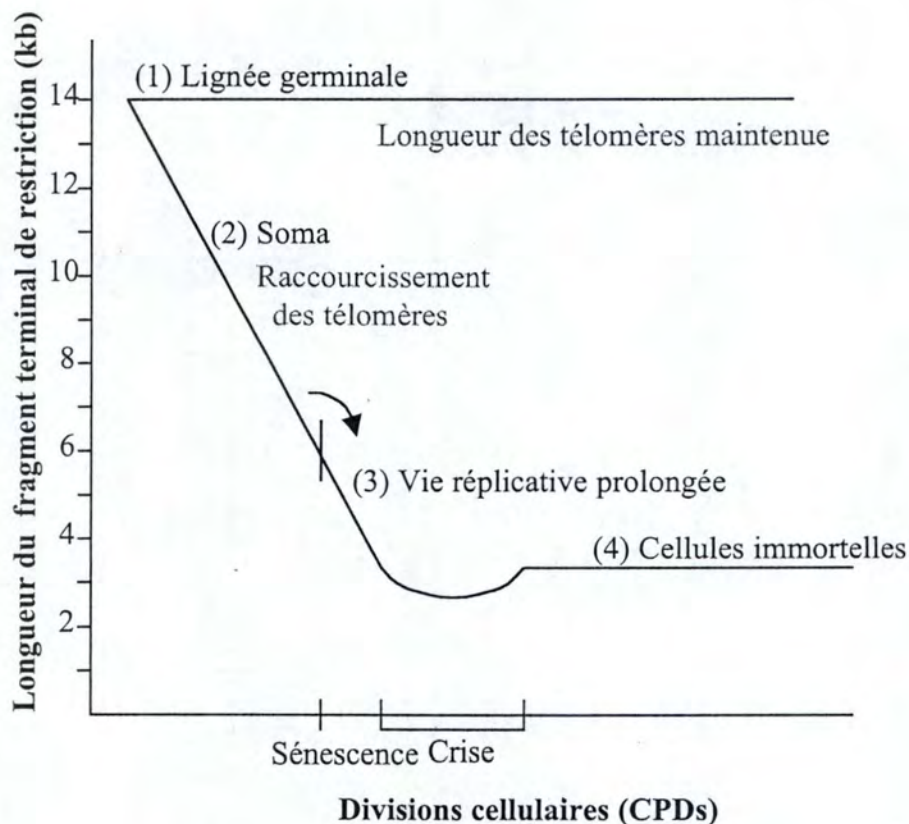
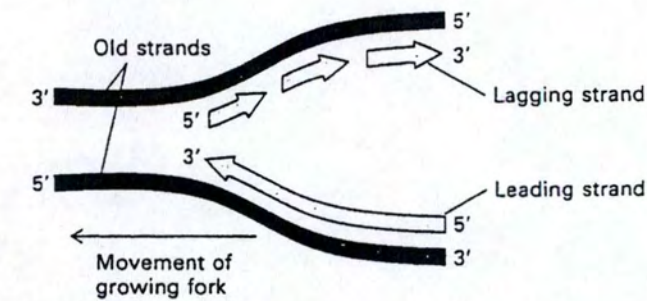


Figure I.8: Modèle présentant la variation de longueur des télomères au cours de la vie proliférative (Greider, 1996). (1) Les lignées germinales ont des télomères longs et ne subissent pas de raccourcissement télomérique car elles disposent d'une télomérase active. (2) Les cellules somatiques subissent un raccourcissement de leurs télomères à chaque division cellulaire. Ce raccourcissement conduit finalement à la sénescence répllicative à moins qu'un événement de transformation n'ait lieu. (3) Les cellules entrent alors dans une phase répllicative prolongée pendant laquelle les télomères continuent de se raccourcir. Cette phase se termine par une période de crise où la plupart des cellules meurent. Néanmoins, les cellules qui émergent de cette crise forment des clones immortels (4). La majorité de ces clones possèdent une activité télomérase. En conséquence ces cellules ne subissent plus de raccourcissement télomérique.



Lagging-strand synthesis

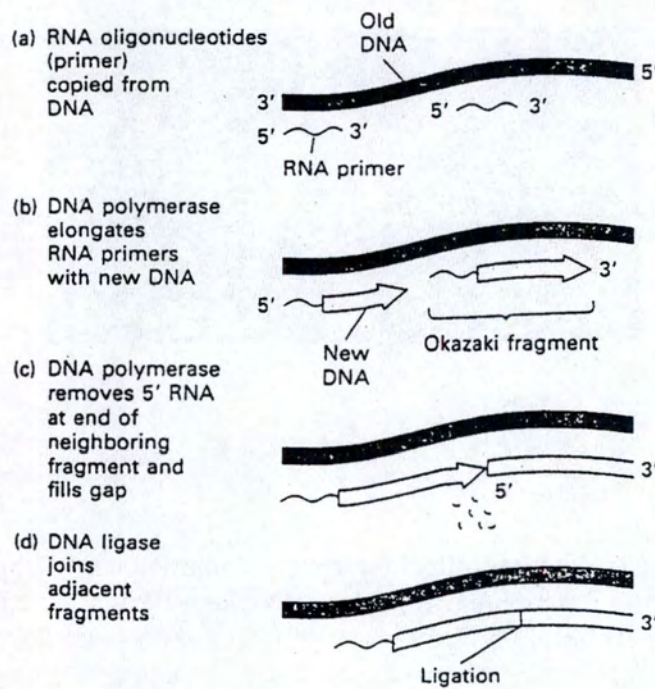


Figure I.9 : Schéma de la répllication de l'ADN par l'ADN polymérase(Lodish, 1995).

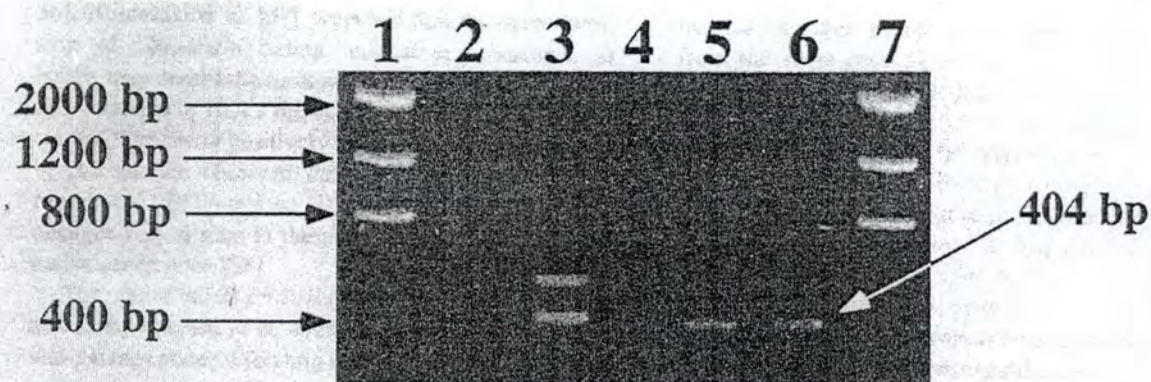


Figure 10 : Détection de la délétion mitochondriale commune de 4977 bp par PCR emboîtée (Nested PCR). Puits 1 et 7 : marqueur de poids moléculaire. Puits 2 : extraits de fibroblastes WI-38 à 55 % de leur potentiel de prolifération. Puits 3 : extraits de fibroblastes WI-38 à 55 % de leur potentiel de prolifération et ayant subi 5 stress d'une heure sous 30 μ M de t-BHP. Puits 4 : contrôle négatif (PCR réalisée sans template). Puits 5 : extraits de fibroblastes WI-38 à 70 % de leur potentiel de prolifération. Puits 6 : extraits de fibroblastes WI-38 à 95 % de leur potentiel de prolifération. La présence de la délétion mitochondriale commune de 4977 bp donne un produit de 404 bp, indiqué par la flèche. A noter une délétion supplémentaire après les stress sous t-BHP (puits 3) (Dumont, 2000).

transfectées avec l'ADNc de la sous-unité catalytique de la télomérase gardent leurs caractéristiques de différenciation (Bodnar *et al.*, 1998).

I.1.3.d. L'altération du génome mitochondrial

L'énergie nécessaire à la cellule provient essentiellement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Elle est donc nécessaire à la survie cellulaire. La mitochondrie possède son propre génome de 16569 bp dont les gènes codent pour les protéines nécessaires aux chaînes de transport des électrons dans la membrane mitochondriale interne. Des mutations et délétions s'accumulent dans le génome au cours du vieillissement. Celles-ci altèrent en conséquence le processus de la respiration. On note par exemple une baisse de l'activité NADH oxydase du complexe I et de la sous-unité III de la cytochrome oxydase du complexe 3, ce qui altère la production d'ATP. La délétion la plus commune mesure 4,977 Kb (figure I.10). Cette délétion mitochondriale peut être détectée par PCR. Il faut cependant plusieurs délétions de l'ADN mitochondrial dans une même cellule pour que cela affecte la production cellulaire globale d'ATP. La cellule possède en effet de nombreuses mitochondries (par exemple 100 mitochondries par fibroblaste et 1000 mitochondries par cellule hépatique) et une même mitochondrie contient plusieurs copies de son génome. Notons que les délétions de l'ADN mitochondrial s'accumulent préférentiellement dans les tissus post-mitotiques, spécialement dans les types cellulaires les plus actifs métaboliquement, où une production importante d'espèces réactionnelles dérivées de l'oxygène est observée.

I.1.3.e. La synthèse protéique et la répllication de l'ADN

De manière générale, on observe une diminution de la capacité de synthèse de l'ADN au cours des passages en culture des fibroblastes humains. Ceci a été mis en évidence en suivant le niveau d'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN au cours des passages en culture (Cristofalo *et al.*, 1973).

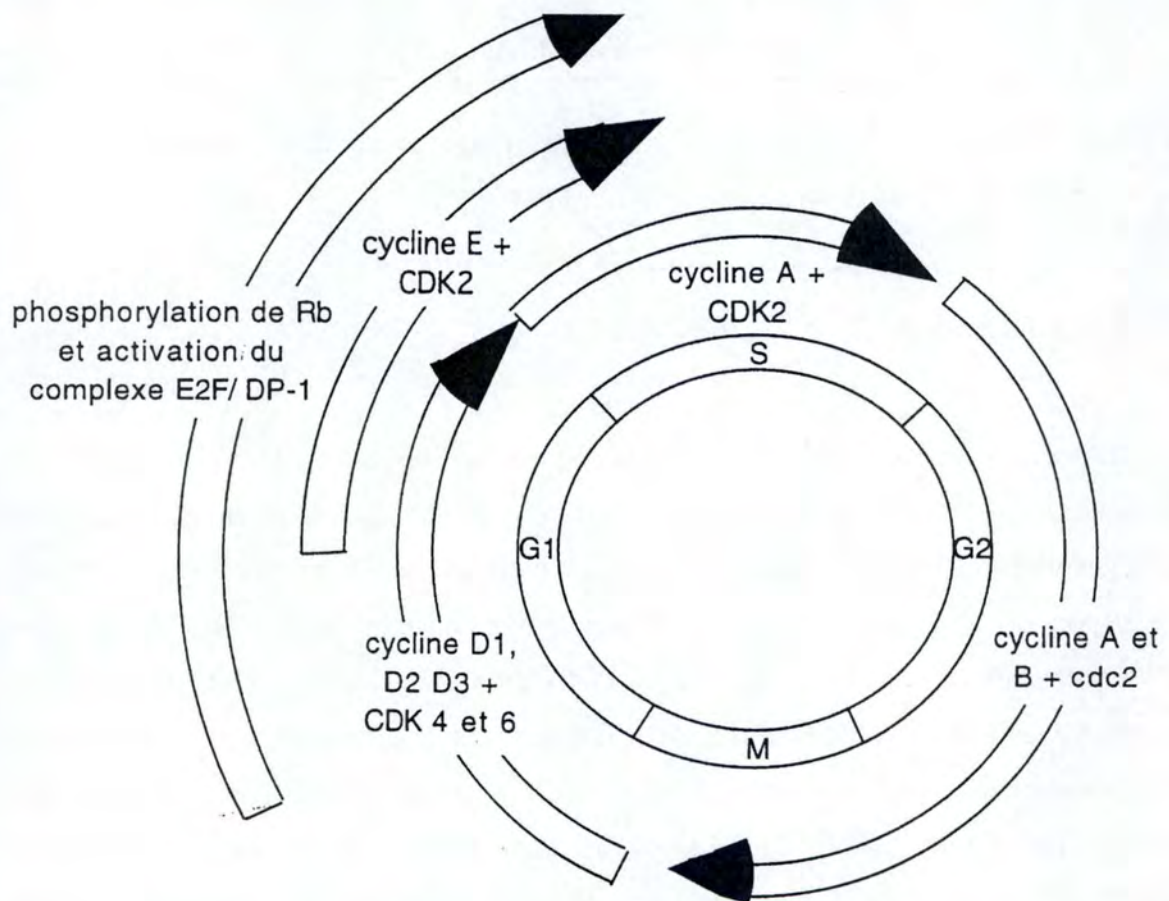


Figure I.11 : Représentation simplifiée de l'implication temporelle des différents complexes cycline-CDK (Ravitz, 1997).

CDK	Poids moléculaire (kDa)	Sous-unité régulatrice	Inhibiteur	Fonctions cellulaires principales
CDK1	34	Cycline B Cycline A	p21 p27	Déclenchement de la mitose
CDK2	33	Cycline A Cycline E	p21 p27	Régulation de la réplication de l'ADN (par l'intermédiaire de E2F ?) Phosphorylation de Rb
CDK3	36	?	?	Régulation de la phase G1
CDK4	34	Cycline D	p21, p27, p15, p16	Phosphorylation de Rb
CDK5	35	Cycline D ?	p21 ?	Participation au métabolisme
CDK6	40	Cycline D	p15, p16, p18	Phosphorylation de Rb
CDK7	42	Cycline H	?	Activation des autres kinases

Tableau I.1 : Propriétés des principales CDKs et leurs rôles cellulaires (Wolowiec, 1996).

I.1.3.f. Régulation du cycle cellulaire

Quatre étapes se succèdent au cours du cycle cellulaire (pour une revue (Weinberg, 1995)) et sont étroitement régulées par la famille des sérine-thréonine kinases dites « cyclin-dependent kinases » (CDKs) (figure I.11). Le cycle est donc dépendant de l'élévation de la concentration ou de la dégradation de ces cyclines. Ces dernières possèdent une région commune d'environ 100 acides aminés, appelée « cyclin box » responsable de la liaison aux CDKs (Pour une revue (Pines, 1994)). Différents complexes cycline-CDK sont successivement exprimés et activés au cours des différentes phases du cycle cellulaire (tableau I.1).

Au cours de l'étape G1, la duplication de l'ADN se prépare. La duplication de l'ADN a lieu au cours de la phase S du cycle cellulaire, à condition que le point de restriction puisse être dépassé, en fin de phase G1. Le point de restriction est le moment critique dont dépend l'achèvement ou non du cycle cellulaire. S'il est franchi, les cellules ne répondent plus aux signaux inhibiteurs et n'ont plus besoin de signaux stimulateurs pour progresser jusqu'à la phase M.

Lors de la sénescence répllicative, l'arrêt définitif de la division cellulaire se fait en phase G1 du cycle cellulaire, empêchant le passage en phase S. Le blocage du cycle cellulaire dans les cellules sénescents est dû à des modifications intervenant à différentes étapes de la phase G1. Seuls les faits les plus marquants conduisant à ce blocage sont repris ci-dessous.

I.1.3.f.a Répression de gènes de réponse précoce aux mitogènes

Ces gènes sont induits rapidement après une stimulation (early response genes) des cellules au moyen de facteurs de croissance. Le proto-oncogène *c-fos*, qui code pour une sous-unité du facteur de transcription hétérodimérique AP-1, est un de ces gènes.

Chez les fibroblastes sénescents, ce gène n'est plus exprimé après stimulation par des facteurs mitogènes.

Chez les fibroblastes jeunes, les mitogènes induisent des voies de transduction du signal (ERK) qui finissent par activer le gène *c-myc*. La protéine c-Myc active SRF (serum responsive factor), une protéine qui se fixe alors sur le site consensus SRE (serum responsive element) du promoteur du gène *c-fos* dont la transcription est alors déclenchée.

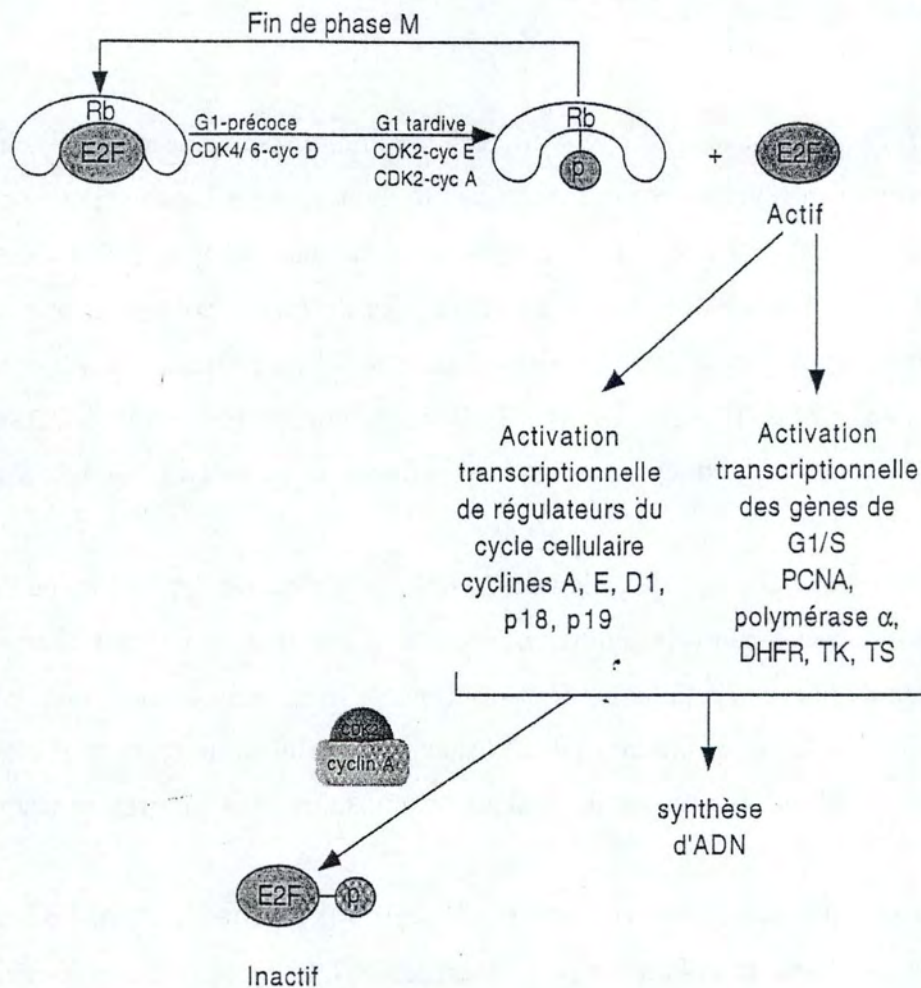


Figure I.12 : Sous sa forme hypophosphorylée, pRB forme un complexe inactif avec le facteur de transcription E₂F. Dans la phase G1, pRB est hyperphosphorylée par des complexes cycline/CDKs, ce qui libère E₂F et rend possible l'entrée en phase S (Lodish, 1995).

Chez les fibroblastes sénescents, SRF devient hyperphosphorylé et ne se fixe plus à SRE; de ce fait, *c-fos* n'est plus transcrit (Atadja *et al.*, 1994).

Les gènes de réponse précoce sont nécessaires au passage en phase S, ce qui donne une première explication du blocage de la prolifération des cellules sénescents.

1.1.3.f.b Répression de gènes de la phase G₁/S

Plusieurs gènes sont inductibles par des facteurs de croissance chez les fibroblastes jeunes. Citons par exemple la dihydrofolate réductase (DHFR), la thymidine kinase (TK), la thymidine synthétase (TS), ou encore la thymidilate synthétase.

Ces enzymes sont nécessaires à la transition G₁/S du cycle cellulaire. Or, ils sont réprimés chez des fibroblastes sénescents. La DHFR, impliquée dans la production des purines, de la glycine et du thymidilate, est régulée au niveau transcriptionnel par un hétérodimère E₂F₁ /DP₁. Le facteur de transcription E₂F est constitué de deux sous-unités. D'une part, soit E₂F₁, E₂F₂, E₂F₃, E₂F₄, E₂F₅, et d'autre part, soit DP₁ ou DP₂.

Dans les fibroblastes sénescents, E₂F₁ est réprimé. Tout ceci est lié à l'état de phosphorylation de pRb (protéine de rétinoblastome). Lorsque la cellule est stimulée par des facteurs mitogènes, pRb hyperphosphorylée ne peut lier E₂F (figure I.12). Ce dernier peut dès lors déclencher la transcription de plusieurs gènes nécessaires au passage en phase S dont E₂F₁ (Farnham *et al.*, 1993).

Au contraire, chez des fibroblastes sénescents, pRb hyperphosphorylée lie E₂F et donc empêche cette transcription et le passage en phase S (Shay *et al.*, 2000) (figure I.13).

1.1.3.f.c Expression d'inhibiteur de kinases dépendantes de cyclines

On sait que les cyclines participent à l'activation de facteurs de transcription (dont E₂F) qui déclenchent l'expression de multiples gènes nécessaires au cycle cellulaire. Par exemple, les complexes CDK₂-CycD, CDK₄-CycD et CDK₆-CycD phosphorylent la protéine pRb (figure I.13). Cependant, une surexpression de CDKIs telles que p21^{waf-1} et p16^{INK4a} est observée lors des derniers passages en culture avant l'arrêt définitif des mitoses (figure I.14). Ces CDKIs se lient aux complexes cyclines-CDK, ce qui entraîne l'impossibilité de phosphoryler pRb (Campisi, 1996).

On sait que l'activité transactivatrice du facteur de transcription p53 doit décliner pour que les cellules puissent entrer en phase S. En conditions normales, l'induction du gène *mdm2*

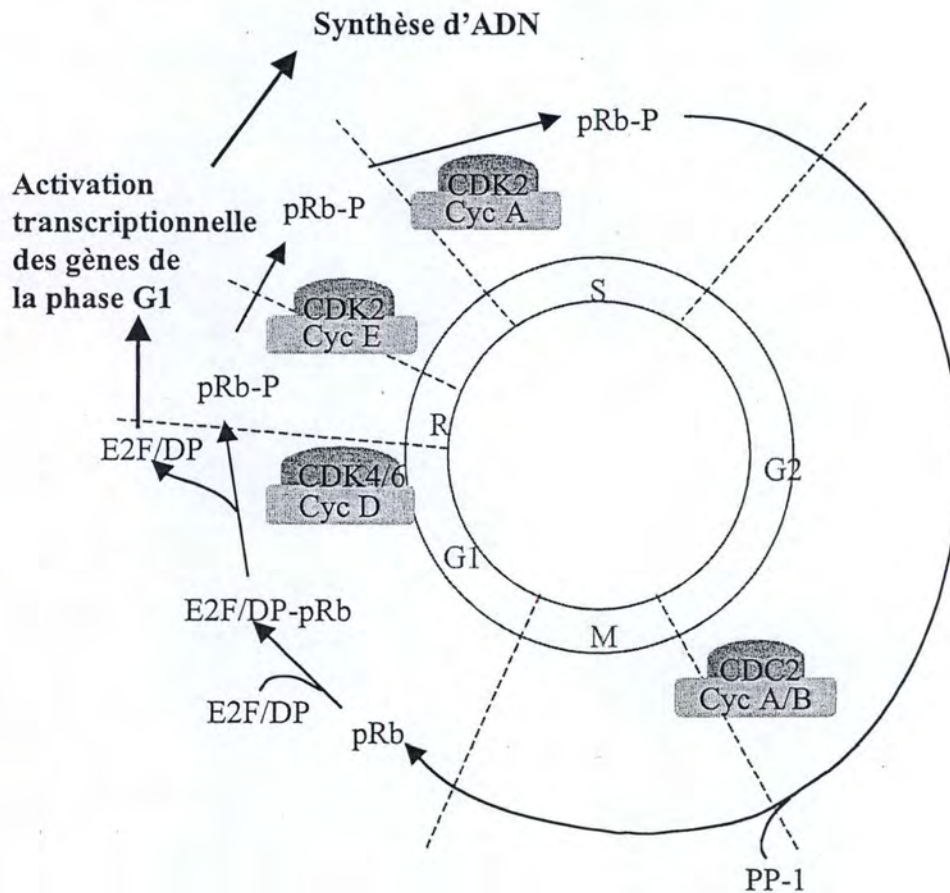


Figure I.13 : Régulation de la phosphorylation de pRb pendant le cycle cellulaire (Graña, 1995). pRb est phosphorylé dès le milieu de la phase G1 par les complexes CDK4/6-cycD. Avec cette phosphorylation de pRb, le point de restriction (R) est franchi. pRb phosphorylé libère le facteur de transcription E2F qui est un activateur de transcription de divers gènes nécessaires à la synthèse d'ADN et à la transition G1/S. La phosphorylation de pRb est maintenue jusqu'en phase M.

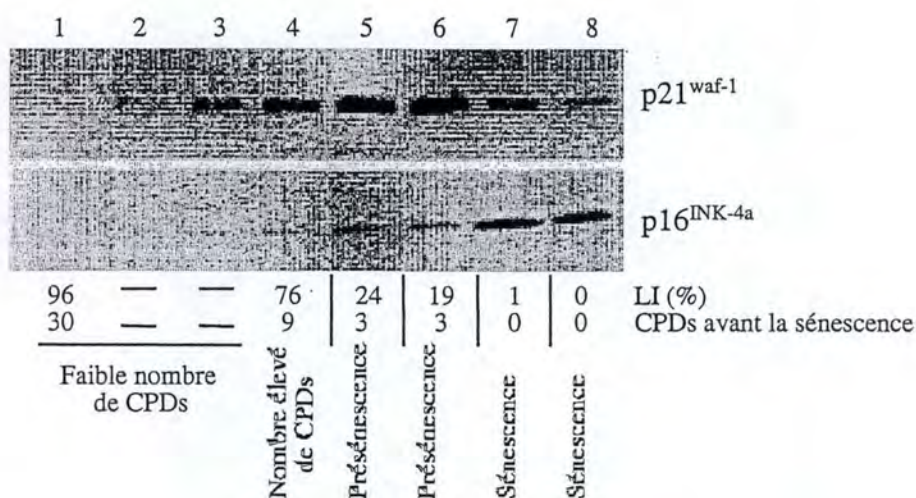


Figure I.14 : Niveau d'expression des inhibiteurs de complexes cycline-CDK et p21^{waf-1} et p16^{INK-4a} en fonction des conditions de cultures et de l'âge des fibroblastes exprimé en PD avant la sénescence (Alcorta, 1996). L'expression de p21^{waf-1} est maximale lors des derniers passages avant l'entrée en sénescence, alors que l'expression de p16^{INK-4a} culmine une fois la sénescence installée. La figure montre le nombre de doublements de population encore à réaliser avant l'entrée en sénescence et le pourcentage de la population réalisant une synthèse d'ADN (LI) pendant la période de 48 h précédant la préparation des extraits protéiques. piste 1 : cellules jeunes en croissance exponentielle, piste 2 : lors de l'arrêt de croissance de cellules jeunes induit par une privation de sérum, piste 3 : arrêt de croissance de cellules jeunes par inhibition de contact, pistes 4 à 6 : expression de ces inhibiteurs dans des cellules âgées à différents doublements de population (9,3,1 CPDs) avant l'entrée en sénescence réplivative, Pistes 7 et 8 : expression de p16^{INK-4a} et p21^{waf-1} lorsque la sénescence réplivative est installée.

par les mitogènes bloque l'effet suppresseur de mitose de p53 car MDM2 favorise la dégradation de p53 par le protéasome. Lorsqu'il y a des dommages à l'ADN dans une cellule jeune, l'activation de p53 et/ou augmentation de la liaison de p53 à sa séquence consensus augmente. Par exemple, p53 se fixe sur le promoteur de p21^{waf-1}, induit sa transcription, ce qui a pour effet final de bloquer le cycle cellulaire. MDM2 n'est plus induit par les mitogènes chez les fibroblastes sénescents, et donc p53 n'est plus dégradé par le protéasome (Pour une revue (Campisi, 1996)).

Pour tous les auteurs, la sénescence répllicative est un arrêt de croissance irréversible observée chez des types cellulaires prolifératifs après épuisement du potentiel prolifératif. Pour les uns, ceci est lié uniquement au raccourcissement des télomères (définition 1). Pour les autres, la sénescence peut-être enclenchée par des agents nocifs endommageant les biomolécules (définition 2). Cette seconde définition est donc un élargissement fonctionnel de la première. Si une population cellulaire est en arrêt de croissance irréversible suite à l'exposition à des facteurs générant dommages, on dira qu'elle présente « un phénotype induit par les stress semblable à la sénescence », selon la définition 1 ou qu'elles sont en sénescence induite prématurément par les stress (=SIPS) selon la définition 2 (Toussaint *et al.*, 2002b).

I.2. Sénescence induite prématurément par les stress

Au sein de l'organisme, la cellule se trouve dans des conditions physico-chimiques relativement stables. Néanmoins, des fluctuations néfastes autrement dit des stress peuvent survenir. Il existe différents types de stress : osmotiques, oxydatifs, mécaniques, ionisants, etc. La cellule doit pouvoir se défendre en activant ou en inhibant certaines voies métaboliques. Les mécanismes de défense sont communément appelés « réponse aux stress ».

In vitro, les types cellulaires prolifératifs (fibroblastes humains, mélanocytes humains, etc.) exposés à des stress d'intensité subcytotoxique (U.V., H₂O₂, hydroxyurée, *tert*-butylhydroperoxyde (t-BHP), éthanol, etc.) subissent la SIPS. L'induction de la SIPS peut-être considérée comme réponse adaptative à long terme après les stress. En effet, elle s'étale sur plusieurs jours après les stress, avant l'apparition de biomarqueurs de la sénescence.

Parmi les nombreuses caractéristiques qu'elles partagent avec les cellules sénescents, les cellules en SIPS montrent une morphologie de type sénescents (Pour une revue (Toussaint *et al.*, 2000b)).

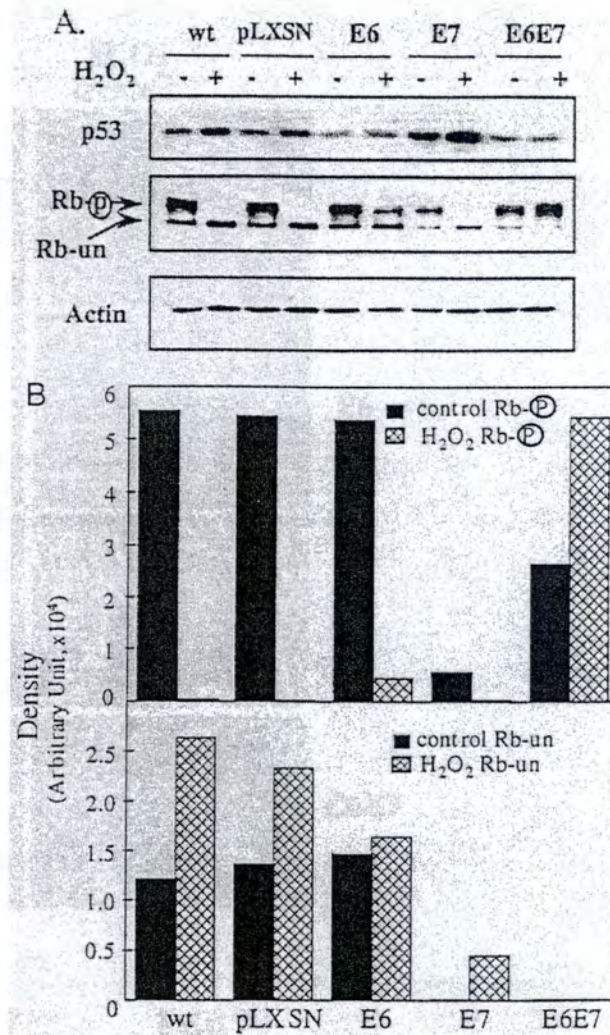


Figure I.15 : L'expression des protéines HPV E6 ou E7 entraîne une forte réduction respectivement de la quantité des protéines p53 ou Rb dans les fibroblastes humains IMR-90. Traîtes avec 150 μ M de H₂O₂ pendant 2 heures ou non. Les cellules ont été lysées, pour déterminer la quantité de protéine p53, Rb par rapport à la quantité d'actine par Western blot.

A) Western-blots.

B) Quantification des résultats pour la quantité de pRb phosphorylée (Rb-p) ou non (Rb-un) (Chen, 2000).

La présence de la protéine Rb est nécessaire à l'apparition de la morphologie de type sénescence après un stress subcytotoxique sous H_2O_2 . On sait que des fibroblastes qui surexpriment la protéine E7 du papillomavirus humain HPV 18, suite à la transfection stable de son ADNc, ne présentent pas de morphologie sénescence après exposition à l' H_2O_2 . Or, cette protéine E7 entraîne la dégradation protéolytique de pRb. On n'observe plus cet effet lorsque les fibroblastes ont été transfectés avec un ADNc muté de E7 donnant une protéine E7 incapable de se lier à pRb (figure I.15).

Après avoir soumis des fibroblastes à 5 stress sous 30 μM de t-BHP, à raison d'un stress par jour et après une période de 48 heures, on observe, tout comme en sénescence répliquative une diminution importante du potentiel prolifératif (diminution de l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN) (figure I.16), une surexpression de $p21^{waf-1}$ et une hypophosphorylation de pRb (Dumont *et al.*, 2000b) (figure I.17). A 72 heures après un stress subcytotoxique sous H_2O_2 , $p21^{waf-1}$ est surexprimé au niveau ARNm et protéique (Fripiat *et al.*, 2000) (Dumont *et al.*, 2000b).

On observe des fibres de stress à 72 heures après exposition de fibroblastes IMR-90 à une dose subcytotoxique H_2O_2 . Ces fibres de stress participent au développement de la morphologie de type sénescence. Elles disparaissent lorsque la protéine E7 est exprimée (Chen *et al.*, 1998) (Chen *et al.*, 2000b).

Le Transforming Growth Factor- $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) est surexprimé chez des fibroblastes humains IMR-90 après stress subcytotoxiques sous H_2O_2 . Ceci entraîne l'apparition de la morphologie de type sénescence. Des anticorps anti-TGF- $\beta 1$, ou anti-recepteur II du TGF- β , incubés en présence de fibroblastes pendant trois jours après stress sous H_2O_2 , bloquent l'apparition de cette morphologie. Notons que la surexpression de TGF- $\beta 1$ disparaît chez des fibroblastes surexprimant E7 (Fripiat *et al.*, 2001).

On a montré que, après des stress sub-cytotoxiques sous U.V., t-BHP, H_2O_2 éthanol ou mitomycine C, les fibroblastes humains acquièrent des caractéristiques morphologiques des morphotypes les plus tardifs, donc caractérisés par un glissement vers les morphotypes plus âgés (Pour une revue (Toussaint *et al.*, 2000b)). La proportion de fibroblastes qui quittent le morphotype « jeune » pour prendre un morphotype « vieux » est fonction du nombre de stress effectués (Toussaint *et al.*, 1995).

Une augmentation importante de la proportion de cellules positives pour la S.A. β -gal est également observée trois jours après exposition à ces stress (Toussaint *et al.*, 2002b) (Toussaint *et al.*, Soumis).

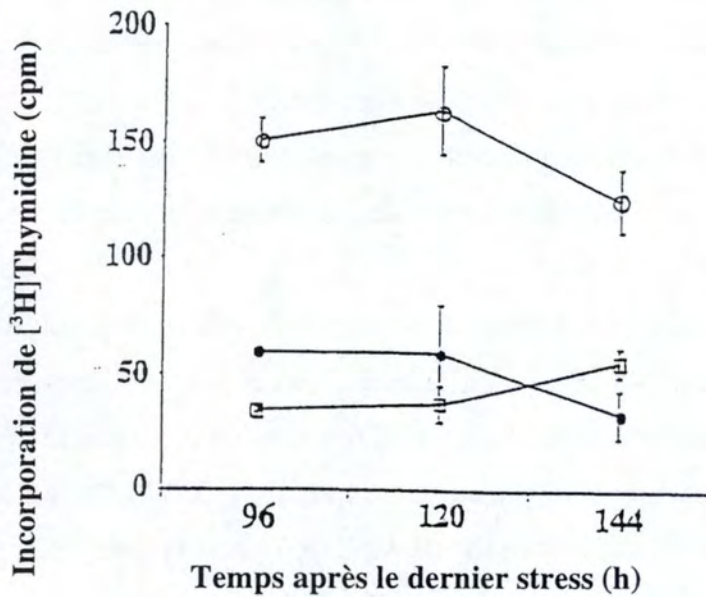


Figure I.16 : Effets à long terme de stress subcytotoxiques répétés au t-BHP sur l'incorporation de $[^3\text{H}]$ -thymidine dans les fibroblastes WI-38 à 96, 120 et 144 heures après le dernier stress, les cellules ont été incubées avec $1\ \mu\text{Ci}$ de $[^3\text{H}]$ -thymidine pendant 3 heures et le niveau de radioactivité a été mesuré. Fibroblastes ayant épuisé moins de 65% de leur potentiel de prolifération au moment des stress (●). Fibroblastes ayant épuisé moins de 65% de leur potentiel de prolifération mais n'ayant subi aucun stress (○). Fibroblastes à 95% de leur potentiel de prolifération (□). Les résultats sont exprimés en coups par minute (cpm) par 10000 cellules et représentent les valeurs moyennes \pm les déviations standards obtenues à partir de 4 expériences (Dumont, 2000).

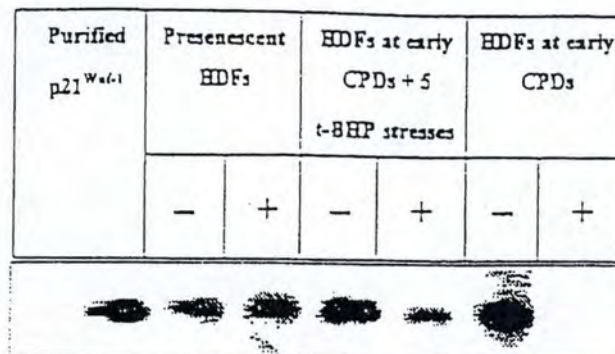


Figure I.17a : Analyse du niveau de la protéine p21^{Waf-1} par Western blot. Les extraits cellulaires proviennent de fibroblastes WI-38 jeunes, de fibroblastes WI-38 âgés et de fibroblastes WI-38 jeunes ayant subi 5 stress sous 30 μ M de t-BHP et ayant récupéré pendant 48 heures après stress. Ensuite, les fibroblastes ont été incubés pendant 48 heures dans un milieu sans facteur de croissance (BME + 0.5% HLA). Après 21 heures de stimulation au BME + 10% FCS (Foetal Calf Serum contenant des facteurs de croissance), les protéines ont été extraites des cellules pour réaliser le Western blot. Les résultats montrés sont ceux obtenus pour les extraits de fibroblastes WI-38 après 48 heures de privation de facteur de croissance (-, non stimulées avec du BME + 10% FCS) et après la stimulation ultérieure avec 10% FCS pendant 21 heures (+) (Dumont, 2000).

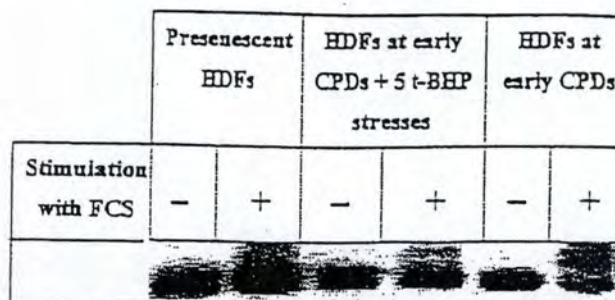


Figure I.17 b : Analyse du niveau de la phosphorylation de pRB par Western blot. Les extraits cellulaires proviennent de fibroblastes WI-38 jeunes, de fibroblastes WI-38 âgées et de fibroblastes WI-38 jeunes ayant subi 5 stress sous 30 μ M de t-BHP et ayant récupéré pendant 48 heures. Ensuite, les fibroblastes ont été incubés pendant 48 heures dans du milieu sans facteur de croissance (BME + 0.5% HLA). Après 21 heures de stimulation au BME + 10% FCS (Foetal Calf Serum contenant des facteurs de croissance), les protéines ont été extraites des cellules pour réaliser le Western blot. Les résultats montrés sont ceux obtenus pour les fibroblastes WI-38 après 48 heures de privation de facteur de croissance (-, non stimulées avec du BME + 10% FCS) et après la stimulation ultérieure avec 10% FCS pendant 21 heures (+) (Dumont, 2000).

En ce qui concerne les gènes dont le niveau d'expression est modifié chez les cellules sénescents, un nombre non négligeable de ceux-ci connaissent des variations similaires en SIPS induite par le t-BHP, H₂O₂ ou les U.V.B (Chen *et al.*, 1998) (Dumont *et al.*, 2002). (Chainiaux *et al.*, soumis). Parmi ces gènes, notons la fibronectine, l' α 1(I) procollagène, l'ostéonectine et l'apolipoprotéine J (apo J). La surexpression de l'apo J est induite par des stress de nature diverse. La surexpression de l'apo J par transfection de son ADNc favorise la survie cellulaire après un stress oxydatifs (t-BHP ou EtOH) et limite la proportion de cellules qui entrent en SIPS (Dumont *et al.*, 2002).

On note une forte diminution de l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN chez les cellules en SIPS déclenchée par H₂O₂ et par le t-BHP. Cette diminution est similaire à celle observée chez les cellules sénescents (Dumont *et al.*, 2002). (Chen *et al.*, 1994). La délétion de l'ADN mitochondrial de 4977 bp apparaît en SIPS induite par le t-BHP (figure 10) (Dumont *et al.*, 2000b).

Au niveau du raccourcissement des télomères, il a été montré que l'exposition de fibroblastes à des stress sous H₂O₂ et t-BHP à des concentrations induisant la SIPS entraîne une accélération du raccourcissement des télomères (Dumont *et al.*, 2001; von Zglinicki *et al.*, 1995).

Parmi les questions importantes restant en suspend, on se demande si la SIPS est totalement similaire à la sénescence répliquative. Y a-t-il d'autres caractéristiques communes que celles connues jusqu'à présent ? Quelles sont les différences ? Pour tenter de répondre à ces questions, deux approches ont été entreprises au laboratoire. La première approche a consisté en une étude protéomique (Dierick *et al.*, soumis pour publication). La seconde approche a été entreprise au niveau transcriptionnel en utilisant la technique du « differential display ». Cette technique est une des approches permettant d'identifier les modifications d'expression génique de cellules d'un type cellulaire donné dans différentes conditions expérimentales. Ainsi cette technique a été utilisée pour rechercher les différences de niveau d'expression génique chez les fibroblastes humains en SIPS induite par le t-BHP ou par l'éthanol, et en sénescence répliquative.

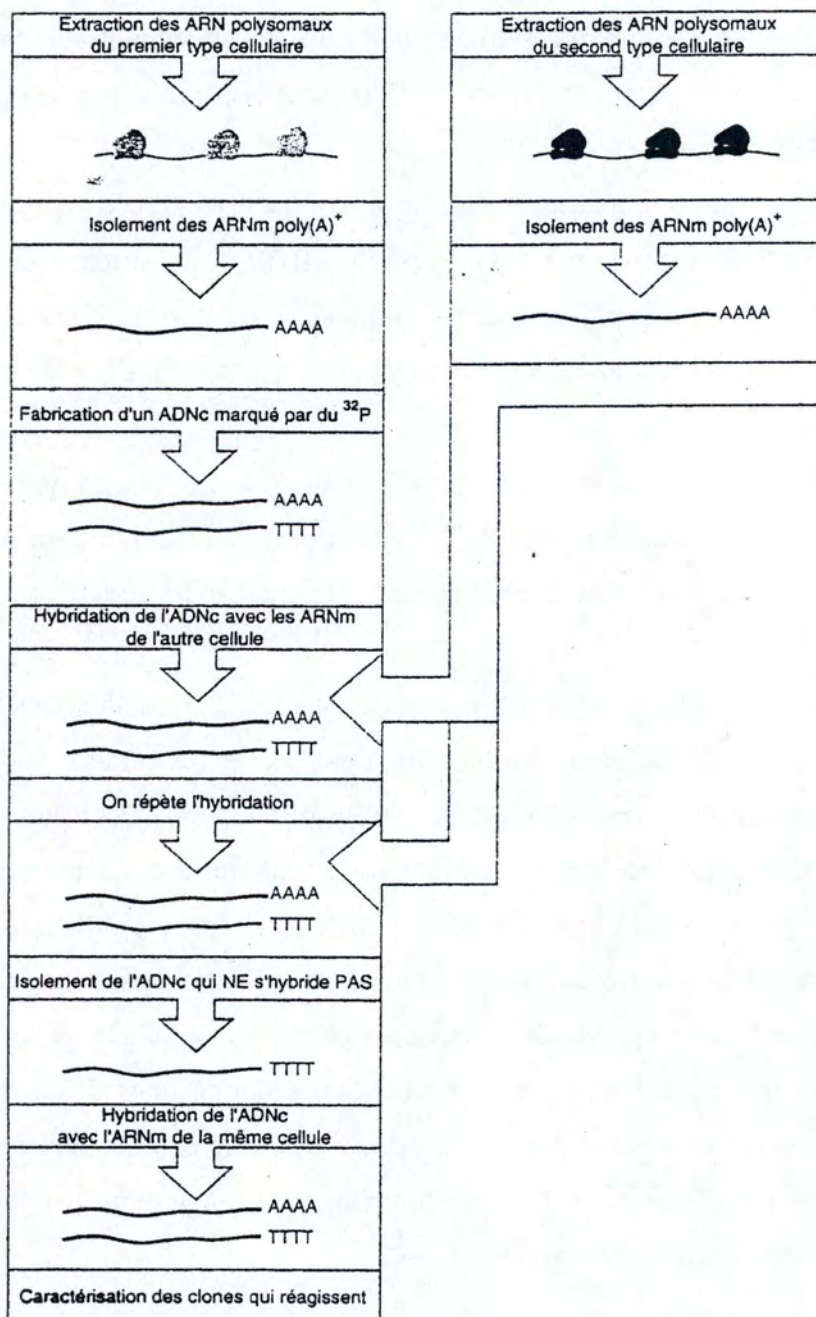


Figure I.18 : Le principe de l'hybridation soustractive (Lewin, 1999).

I.3. Comparaison transcriptomique de la SIPS et de la sénescence répliative

La comparaison du niveau d'expression génique chez différents types cellulaires fournit des informations utiles pour comprendre les mécanismes sous-jacents à divers processus biologiques. Plusieurs techniques ont été mises au point afin d'étudier cette expression génique, et plus particulièrement pour trouver des gènes dont on ne savait pas qu'ils sont impliqués dans un processus biologique donné. Citons par exemple l'hybridation soustractive, l'analyse différentielle représentative, la technique SAGE, ou encore le differential display RT-PCR.

Viennent ensuite d'autres techniques telles que le northern blotting, la RT-PCR semi-quantitative, la RNase Protection assay, les micro-damiers à ADN ou la Real-Time PCR qui elles, sont utiles pour vérifier des modifications du niveau d'expression de gènes définis.

I.3.1. L'hybridation soustractive

Ici, on part d'une population cellulaire dite « de référence ». Les ARNm sont extraits des cellules et isolés. Vient ensuite une transcription inverse afin de synthétiser de l'ADN. Ce dernier est marqué au ^{32}P et hybridé avec les ARNm d'une seconde population cellulaire (la population étudiée). Les ARNm non hybridés, c'est-à-dire étant non-exprimés dans la population de référence, sont récupérés. On peut ensuite rechercher, dans les banques d'ADNc, les gènes auxquels ils correspondent (figure 18). Depuis sa mise au point, l'hybridation soustractive a été grandement utilisée, plusieurs modifications y ont été apportées afin d'augmenter son efficacité. Cependant, cette technique ne permet pas de comparer plus de deux populations cellulaires à la fois. Un autre inconvénient est que cette technique nécessite une quantité élevée d'ARN de départ, ce qui n'est pas toujours évident à obtenir dans des systèmes *in vitro* délicats.

I.3.2. L'analyse différentielle représentative (RDA)

Cette technique compare l'expression génique de 2 populations cellulaires. La première étant prise comme référence et la deuxième étant la population test (figure I.19).

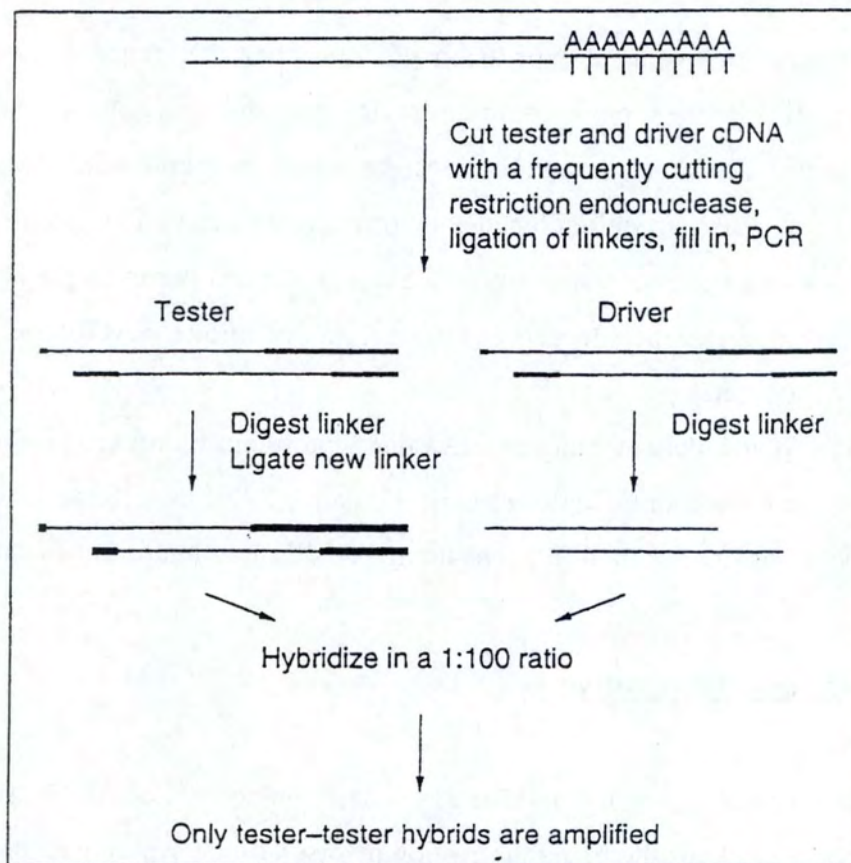


Figure I.19 : Le principe de l'analyse représentative (RDA) (Kozian, 1999).

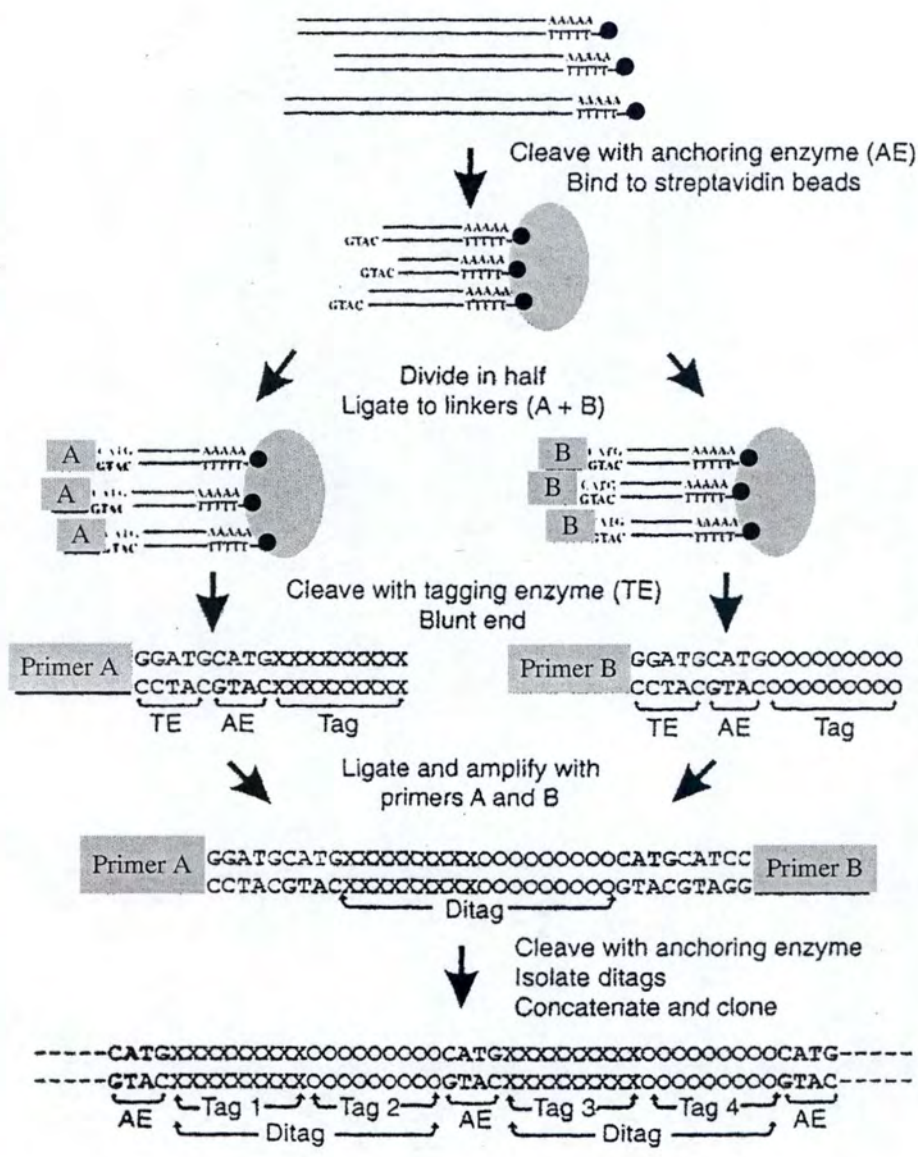


Figure I.20 : Le principe de l'analyse de l'expression génique en série. (SAGE) (Velculescu, 1995).

Le principe en est le suivant : l'ARN extrait des échantillons est placé en contact d'une endonucléase. Celle-ci coupe fréquemment et les fragments ainsi générés sont attachés de chaque côté à des ligands. Les vides sont comblés afin d'aboutir à une population de rétro-transcrits double brin. L'ensemble est amplifié par PCR. On remplace les ligands par d'autres, uniquement pour la population test. Les deux populations sont mises en contact afin d'hybrider les séquences complémentaires (et donc exprimées chez les deux). Cela se fait suivant un rapport 1 : 100 en ce qui concerne les concentrations des échantillons tests : référence, respectivement. On récupère les homoduplex restant dans la population test, qui sont les seuls à pouvoir s'hybrider, puis on les séquence. Cela se fait en utilisant comme amorces les séquences des ligands. Cette technique permet l'amplification, et donc la détection, de transcrits rarement exprimés. La RDA a été utilisée avec succès lors de plusieurs études. Par exemple, elle a permis de mettre en évidence des gènes exprimés de façon différentielle et faiblement lors du développement, de pathologies et de stimulations avec des facteurs de croissance. (Kozian *et al.*, 1999).

I.3.3. La technique de SAGE (Serial Analysis Gene Expression)

La technique SAGE est assez complexe dans sa mise en oeuvre. Néanmoins, elle permet de mettre en évidence les gènes qui sont exprimés dans une cellule, dans une condition donnée et ce, à la fois de manière quantitative et qualitative (Velculescu *et al.*, 1995). De plus, elle permet de comparer l'expression de gènes dans plus de 2 conditions différentes

Le principe de base de cette technique se fonde sur le présupposé suivant : il existe une séquence nucléotidique d'environ 9 bp (séquence « Tag ») qui est située à un endroit précis dans le transcrit et qui est propre à chacun d'eux. De ce fait, statistiquement, il doit exister 4^9 combinaisons de séquences "tag" différentes, ce qui est largement suffisant pour couvrir l'ensemble des gènes exprimés par une cellule à un moment donné.

Voici les différentes étapes de ce processus (figure I.20):

* Grâce à ces amorces poly-T biotinylées, on effectue une transcription inverse suivie d'une PCR. On obtient ainsi de l'ADNc double-brin. Ces ADNc sont mis en présence d'une enzyme de restriction (encoring enzyme). Celle-ci a la propriété de couper fréquemment l'ADN et donc on s'assure que chaque transcrit est clivé au moins une fois.

* On isole les ADNc via leur extrémités 3' en les mettant en présence de billes de streptavidine. On récupère donc tous les transcrits qui ont été clivés au site le plus proche de

Differential display

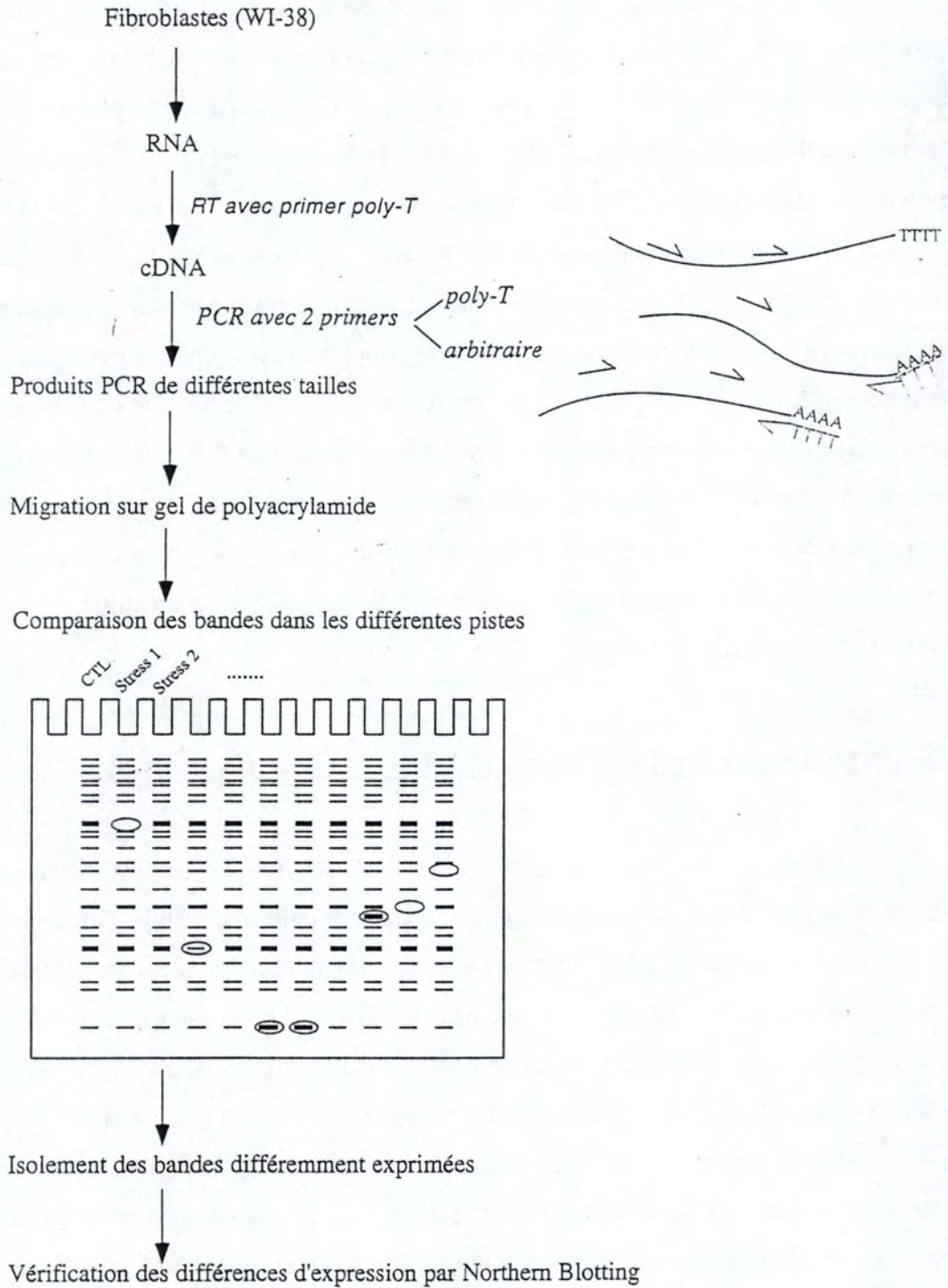


Figure I. 21 : Le principe du differential display.

leur extrémité 3'. Les ADNc sont ensuite séparés en deux populations, en fonction desquelles on leur lie (côté 5') un type spécifique de ligand (A ou B). Ces ligands ont la caractéristique de contenir eux-même un site de restriction pour une enzyme de type IIS (tagged enzyme). Ce type d'enzyme a la particularité de couper à bouts francs un nombre de bases fixes après avoir reconnu leur site de restriction.

* On met en présence les ADNc couplés à leur ligand et les enzymes de type IIS et on obtient ainsi de l'ADN composé d'un ligand, de deux sites de restriction (un pour la "Tagged enzyme", un autre pour l'"Anchoring enzyme") et d'un site de plus ou moins 10 bp spécifique du transcrit.

* Les ADNc sont alors liés 2 à 2 pour former des dimers appelés « ditag » par combinaison aléatoire. Ces « ditag » peuvent ensuite être de nouveau clivés par l'Anchoring enzyme et associés par dizaines puis clonés dans des vecteurs qui permettront leur séquençage. Ensuite, une recherche dans les banques de données peut commencer et permettre de trouver les gènes correspondants.

I.3.4. Le differential display

Cette technique a été proposée en 1992 (Liang *et al.*, 1992) comme permettant de comparer l'expression génique dans deux ou plusieurs populations cellulaires.

Voici le principe de cette technique appliquée à notre étude (figure I.21). On extrait l'ARN total de fibroblastes WI-38 jeunes ou sénescents ou ayant subi 72 heures auparavant des stress répétés sous t-BHP ou EtOH ou non, cellules. Afin de prévenir toute contamination par l'ADN génomique, l'ARN est traité avec la DNase-I, cette étape faisant partie des améliorations apportées à la méthode originale pour limiter les faux positifs (Liang *et al.*, 1995).

On effectue alors une transcription inverse afin d'obtenir de l'ADN complémentaire à partir de l'ARN extrait. Cette transcription inverse se fait grâce à des amorces poly-T (4 différentes avec T₁₆VN où V est A, G ou C, et N est A, G, C ou T). Ces amorces nous permettent de sélectionner les ARNm parmi l'ARN total (la queue poly-T s'hybride uniquement sur les poly-A des ARNm). Grâce à la base représentée en N, on sépare l'ARNm en quatre sous-populations différentes (suivant que le N soit A, G, C ou T).

Ces amorces sont réutilisées dans l'étape de PCR qui suit, en association à une amorce aléatoire arbitrairement choisie. Ceci, afin d'amplifier les ADNc néo-synthétisés. Celle-ci doit répondre à une série de critères :

- Sa séquence doit avoir été choisie « au hasard » afin d'augmenter les chances de disposer d'une série d'amorces bien différentes permettant d'amplifier un maximum d'ADNc.
- Il ne doit pas exister de possibilité d'hybridation au sein d'une même séquence d'amorce (pas de formation de "hairpin", ni de dimères de l'amorce).
- La température d'hybridation des amorces arbitrairement choisies doit être proche de celle des amorces poly-T.

En tout, 60 couples d'amorces sont utilisés. Des oligonucléotides marqués radioactivement [α - ^{33}P -dATP] sont utilisés lors de cette PCR.

Les fragments d'ADN néosynthétisés sont donc marqués au ^{33}P . Cet isotope est reconnu pour allier la sensibilité du ^{32}P et la résolution du ^{35}S tout en ayant des avantages pratiques puisque sa manipulation ne requiert pas d'écrans de protection, comme c'est le cas pour le ^{32}P .

Les produits PCR sont chargés sur gel de polyacrylamide à 6% où ils migrent plus ou moins loin en fonction de leur taille (les plus long fragments vont moins loin). Après autoradiographie, on analyse les bandes. Les candidats (fragments d'ADNc) intéressants c'est-à-dire qui présentent des variations dans au moins une des conditions étudiées sont récupérés par découpe du gel. L'intensité de la bande étant théoriquement proportionnelle à la quantité de transcrits présents dans les cellules au moment de l'extraction de l'ARN.

Les fragments récupérés sont réamplifiés, clonés et séquencés. Les séquences sont analysées par alignement dans les banques de données.

Les principaux avantages du differential display sont, d'une part, la possibilité de comparer la variation d'expression de transcrits dans plus de deux populations à la fois. D'autre part, une faible quantité en ARN est nécessaire, ce qui n'est pas négligeable lorsque l'on travaille sur des modèles *in vitro*, dans lesquels il y a peu de matériel disponible.

Toutefois, l'inconvénient principal de cette technique reste, malgré les améliorations apportées depuis sa mise au point, la présence de faux-positifs qui rendent nécessaires la vérification, par des méthodes alternatives, des différences d'expression observées. Comme améliorations, on peut citer le traitement préalable de l'ARN à la DNase, l'augmentation de la température d'hybridation dès le cinquième cycle lors de la PCR, la limitation des recoupements possibles lors de l'utilisation d'amorces aléatoires arbitrairement choisies.

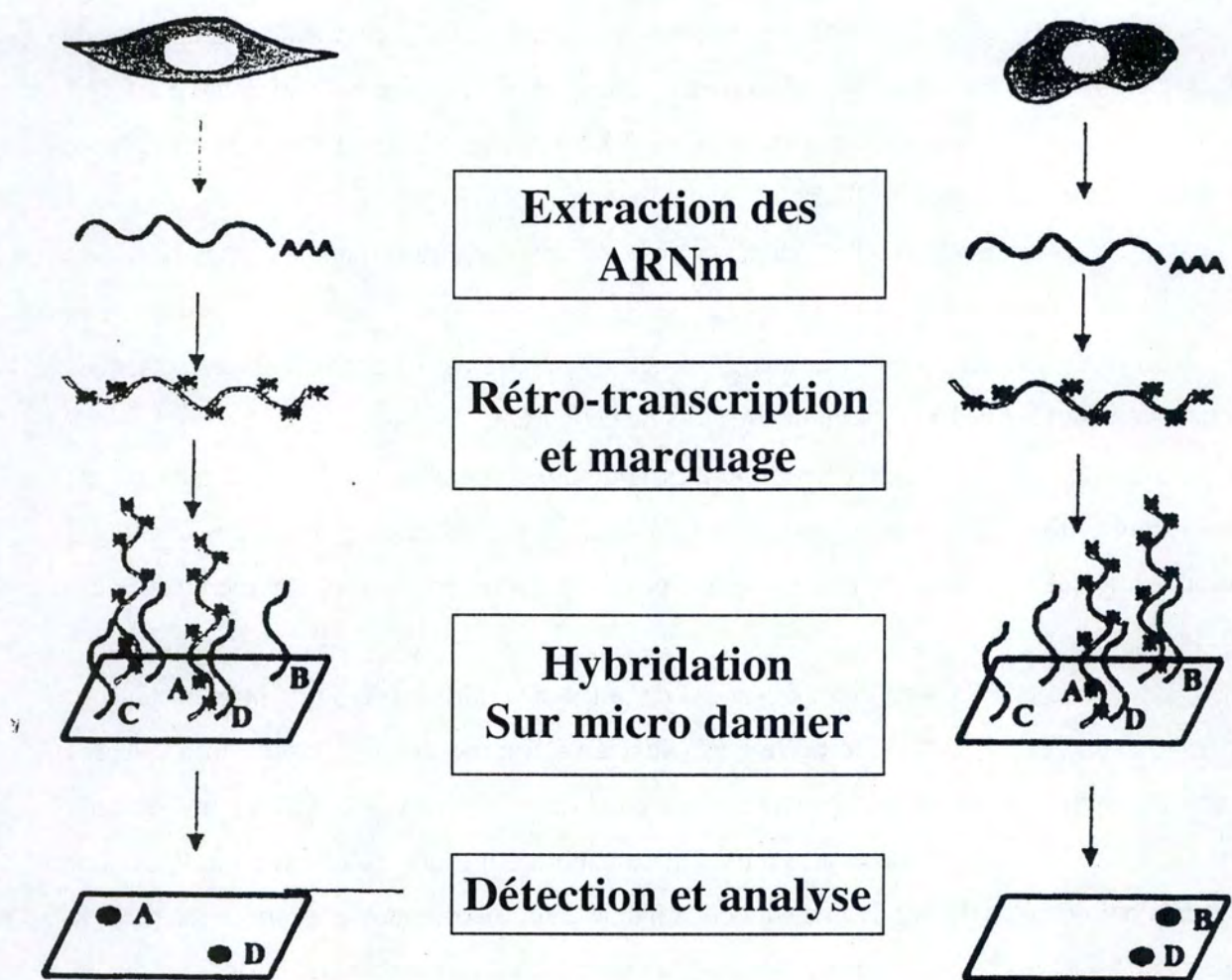


Figure I.22 : Le principe de l'analyse des transcrits au sein d'une cellule par révélation sur biochips.

Il ne faut pas négliger non plus le fait qu'une population hétérogène d'ADNc peut être présente dans une même bande du gel. Ceci étant dû au fait que des fragments générés peuvent avoir une taille très proche l'un de l'autre.

Cependant, de nombreuses études utilisant cette technique ont été réalisées avec succès. Citons comme exemple les travaux de Linskens *et al.* où le differential display a été utilisé afin de rechercher des différences d'expression génique entre des cellules jeunes et des cellules âgées (Linskens *et al.*, 1995).

Le differential display a été utilisé au laboratoire dans le but de comparer les différences d'expression des transcrits de quatre populations cellulaires différentes. Il s'agit de cellules jeunes (contrôles), sénescences, et en SIPS (suite à des stress à l'EtOH ou au t-BHP).

I.3.5. Les micro-damiers à ADN

Cette technique se base sur l'hybridation d'ARN ou d'ADN (issus d'une population cellulaire déterminée) sur des oligonucléotides, eux-même greffés sur un support solide. Elle a été mise au point dans le but de miniaturiser le principe du « reverse blot ». Celui-ci permet l'hybridation d'une séquence d'ADN sur une banque d'ADNc greffée sur un filtre en nylon (Lander, 1999).

Elle se base sur le principe suivant, l'ADN capteur est fixé sur un support par exemple en verre, ou en polymère. Le verre est le plus exploité vu sa transparence, sa rigidité, et sa faible émission en fluorescence (Cheung *et al.*, 1999). L'ARN extrait d'une population cellulaire est mis en contact avec le micro-damier et s'hybride avec les capteurs, lorsque les séquences sont complémentaires. Les hybrides formés sont détectés grâce au marquage fluorescent de la cible (figure I.22). L'avantage de cette technique est que l'on peut vérifier la variation d'expression de nombreux transcrits simultanément (Godfroid, 2000).

I.3.6. Le Northern blotting

Cette technique permet la détection d'un transcrit donné par hybridation d'une sonde d'ADN complémentaire marquée radioactivement.

En pratique, l'ARN total est séparé en fonction de la taille par électrophorèse en gel d'agarose dénaturant. Après migration, l'ARN est transféré par capillarité, sur une membrane

puis y est fixé de manière covalente, de nylon. La membrane est alors incubée en présence de la sonde oligonucléotidique marquée radioactivement.

Présentée en 1977, cette technique d'hybridation reste toujours une référence. Elle est sensible et spécifique de la détection d'acides nucléiques mais la procédure est laborieuse et nécessite une quantité importante d'ARN.

I.3.7. RNase Protection assay

De nouveau, une sonde d'ADN complémentaire de l'ARN recherché est mise en contact avec l'ensemble des ARNm extraits de cellules et ayant migré sur gel. Les séquences complémentaires s'hybrident et forment donc un double brin. Si l'ensemble des extraits est mis en présence d'une RNase A, cet hybride ARN-ADN est protégé contre la dégradation. La RNase reconnaît et dégrade tous les autres ARNm simples brins. L'hybride est ensuite visualisé sur gel d'électrophorèse. Cette technique est souvent utilisée pour étudier le niveau d'expression de plusieurs gènes en même temps en utilisant des sondes de différentes longueurs, avec une longueur spécifique par gène étudié.

I.3.8. RT-PCR semi quantitative

La transcription inverse suivie d'une PCR (RT-PCR) est une méthode assez sensible pour la détection de transcrits en faible abondance.

Dans un premier temps, l'ARNm est rétrotranscrit en ADNc. Ensuite un fragment de cet ADNc est amplifié par PCR. Le choix des amorces est déterminant si on veut s'assurer de détecter uniquement l'ARNm et pas l'ADN génomique qui lui correspond. Il est judicieux est de choisir les amorces à l'endroit où 2 exons se juxtaposent alors que dans l'ADN génomique, ces 2 exons sont éloignés et séparés par un intron. Ces amorces ne s'hybrideront donc pas sur l'ADN génomique.

Pour pouvoir réaliser un test semi-quantitatif, le nombre de cycles réalisés lors de l'étape de PCR est déterminant. Ce nombre de cycle doit être choisi de manière à terminer l'amplification dans la phase exponentielle de la réaction de PCR, ceci nécessite la réalisation d'une cinétique d'amplification pour chaque transcrit étudié. De cette manière, la quantité d'amplicons produite est proportionnelle à la quantité de transcrits au départ de la réaction.

Fluorescence

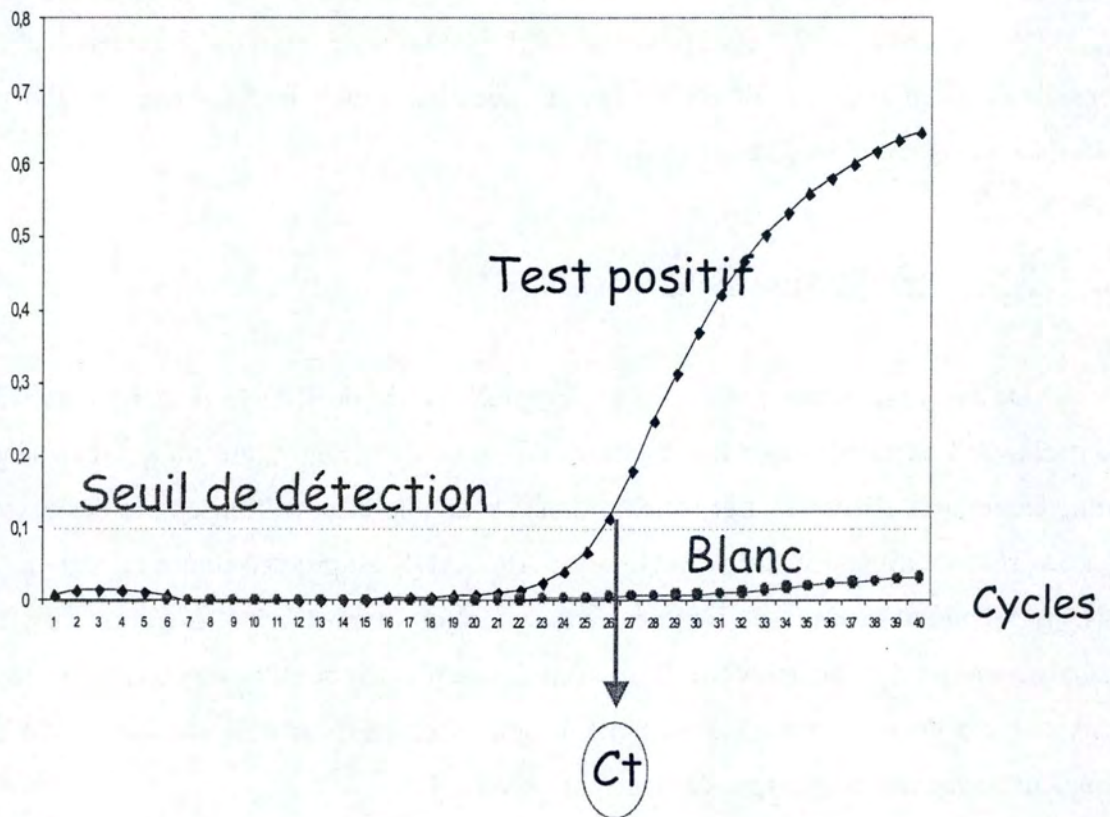


Figure I.23 : Représentation de l'amplification exponentielle des produits PCR par rapport au seuil de détection, au cours des cycles PCR d'une PCR en temps réel (Salmon, 2002).

La RT-PCR semi-quantitative permet de comparer les niveaux d'expression d'un transcrit dans au moins deux populations différentes de cellules (Bustin, 2000).

I.3.9. Real-Time PCR

La PCR en temps réel est une méthode permettant de détecter l'expression de transcrits, même faiblement abondants. Actuellement, la « Real-Time PCR » est de plus en plus utilisée pour quantifier les effets de changements physiologiques au niveau de l'expression génique.

Elle permet de mesurer l'accumulation des produits PCR fluorescents au cours de la réaction (figure I.23). Ceci est permis par la mesure de la fluorescence émise à chaque cycle. Les amplicons peuvent être rendus fluorescents de différentes manières. Celle choisie lors de notre travail donne une fluorescence émise par une petite molécule qui s'intercale de façon non spécifique dans l'ADN double brin, le SYBR GREEN. Ce dernier émet un signal fluorescent une fois intercalé dans l'ADN double brin. Ainsi, il permet de révéler l'accumulation des amplicons synthétisés au terme de chaque cycle PCR.

Il existe d'autres systèmes de révélation basés sur des sondes spécifiques d'une partie de la séquence amplifiée. Il s'agit de sondes fluorescentes (Taq-Man, sondes d'hydrolyse, sondes d'hybridation).

Pour être semi-quantitative, la PCR doit être tout à fait spécifique de l'amplicon défini. La détection de fluorescence via le SYBR GREEN n'étant pas une méthode spécifique, il faut vérifier la spécificité de l'amplicon deux façons : via une courbe de dissociation et par visualisation du produit PCR par électrophorèse en gel d'agarose.

La courbe de dénaturation thermique des produits PCR est réalisée en fin de PCR en augmentant progressivement la température de 60°C à 95°C, donc au dessus de la température d'hybridation des amplicons. Lorsqu'il y a dénaturation des amplicons, le SYBR GREEN est libéré et on observe une chute brutale de la fluorescence.

Sur un graphique représentant la dérivée de la variation du signal de fluorescence en fonction de la température, cette libération soudaine de SYBR GREEN se traduit par un pic. La présence d'un seul pic reflète la présence d'une seule population d'amplicons.

La quantification du niveau d'ADNc du départ de la PCR se fait par la détermination du cycle seuil (Ct). Ce cycle correspond au moment où le signal de fluorescence émis par le SYBR GREEN peut être discriminé du niveau basal (bruit de fond). Un Ct précoce traduit une

forte quantité d'ADNc au départ, alors qu'un Ct tardif est signe d'une quantité plus faible d'ADNc dans l'échantillon analysé.

Cette quantification se fait en parallèle avec celle d'un gène dont le niveau d'ARN est stable dans les diverses conditions étudiées, c'est le gène de référence (Bustin, 2000) (Pour une revue (Salmon, 2002)).

Face à toutes ces techniques d'analyse de variation d'expression transcriptionnelle, l'utilisateur doit effectuer un choix en fonction des avantages et inconvénients de chacune. Mais également en fonction de ses besoins et des caractéristiques des modèles étudiés.

But du mémoire

II. But du mémoire

La technique de "differential display" a été utilisée au laboratoire pour réaliser une comparaison au niveau transcriptomique des fibroblastes humains sénescents ou en SIPS induite par le t-BHP ou l'éthanol. Une partie significative des différences de niveau d'expression suggérée pour le "differential display" devaient encore être traitées, y compris 46 bandes connaissant des variations d'intensité à la fois en SIPS et en sénescence, ou dans les deux types de SIPS.

Dans ce travail, nous allons nous attaquer tout d'abord à l'identification des gènes correspondant à ces 46 bandes.

Pour ce faire, les fragments d'ADNc contenus dans ces 46 bandes, vont être clonés dans les plasmides qui serviront à transformer des bactéries. *Les inserts pourront ensuite être* séquencés et identifiés. Ensuite, pour les candidats identifiés qui présentent un intérêt dans la cadre de la problématique de la SIPS, nous vérifierons les variations de leur niveau de transcrits dans les conditions expérimentales étudiées. La technique de PCR en temps réel sera utilisée à cette fin. Cette vérification est nécessaire puisque le "differential display" génère de nombreux faux positifs.

Enfin, nous étudierons, par western-blot, les variations de quantité de protéines correspondantes aux gènes identifiés, dans le cas où un anticorps spécifique est disponible.

**Matériels
et
Méthodes**

III. Matériels et méthodes

III.1. Clonage des fragments d'ADNc

III.1.1. Récupération des fragments d'ADNc

L'analyse du film autoradiographique obtenu par DD RT-PCR permet de mettre en évidence les bandes intéressantes dans le cadre de notre travail, c'est-à-dire les bandes dont l'intensité diffère dans la sénescence répllicative et/ou dans la sénescence induite prématurément par les stress par rapport à la situation contrôle.

La juxtaposition du film autoradiographique et du gel de polyacrylamide séché permet de découper les fragments d'ADNc correspondants aux bandes d'intérêts. Cette opération est réalisée au moyen d'une lame sécable, renouvelée pour chaque bande de manière à éviter toute contamination croisée. L'ADNc est élué par immersion de la bande découpée dans de l'eau distillée.

III.1.2. Amplification des fragments d'ADNc d'intérêt

(Griffin *et al.*, 1994)

La PCR (réaction de polymérisation en chaîne) consiste à amplifier spécifiquement un fragment d'ADN (matrice). Ce procédé requiert l'utilisation de deux amorces oligonucléotidiques capables de s'hybrider de part et d'autre de la séquence à amplifier des désoxynucléotides et d'une ADN polymérase thermostable.

La base de la PCR consiste en 3 étapes qui forment un cycle. Chaque étape est réalisée à une température définie.

1. La dénaturation de l'ADNc cible en 2 brins monocaténares est réalisée à 94°C.
2. L'hybridation des amorces permet leur association avec les régions correspondantes de l'ADN cible permet à la polymérase de générer un fragment d'ADN double brin. La température à laquelle elle se déroule dépend des amorces utilisées. Dans le cas présent, elle est de 60°C.

3. L'élongation s'effectue à 72°C. La polymérase synthétise le brin d'ADN complémentaire à celui sur lequel elle se déplace, générant donc de l'ADN bicaténaire.

La PCR est réalisée par l'enchaînement de cycles successifs, le produit de chaque cycle pouvant être utilisé comme cible pour les cycles ultérieurs. Il en résulte une amplification exponentielle de la séquence d'ADN cible. En théorie, n cycles permettent de générer 2^n copies d'un fragment d'ADN cible.

La PCR est utilisée ici pour amplifier les ADNc d'intérêt provenant du DD RT-PCR, de manière à fournir suffisamment de matériel pour les étapes ultérieures.

III.1.2.a. Préparation du mélange réactionnel

La mixture réactionnelle contient:

- Amorce poly-T [1 μ M] (Eurogentec, Liège, Belgique)
- Amorce aléatoire arbitrairement choisie [1 μ M] (Eurogentec, Liège, Belgique)
- dNTP [2mM] (Eurogentec, Liège, Belgique)
- Tampon de la polymérase (Biotools, B&M Labs, Spain)
- Taq Polymérase 1U(Biotools, B&M Labs, Spain)
- Eau distillée
- ADN matrice

III.1.2.b. Programmation des cycles PCR

(Appareil PCR utilisé : Perkin Elmer, Gene amp, PCR system 2400)

Les conditions de PCR sont les suivantes :

- 94°C pendant 5 min
- 40 cycles : 94°C pendant 30 sec
60°C pendant 30 sec
72°C pendant 30 sec
- 72°C pendant 10 min

Concentration en agarose (%)	Séparation efficace de molécules d'ADN (Kb)
0,6	1-20
0,7	0,8-10
0,9	0,5-7,0
1,2	0,4-6,0
1,5	0,2-3,0
2	0,1-2,0

Figure III.1 : Concentration en agarose en fonction de la taille des fragments d'ADN à séparer

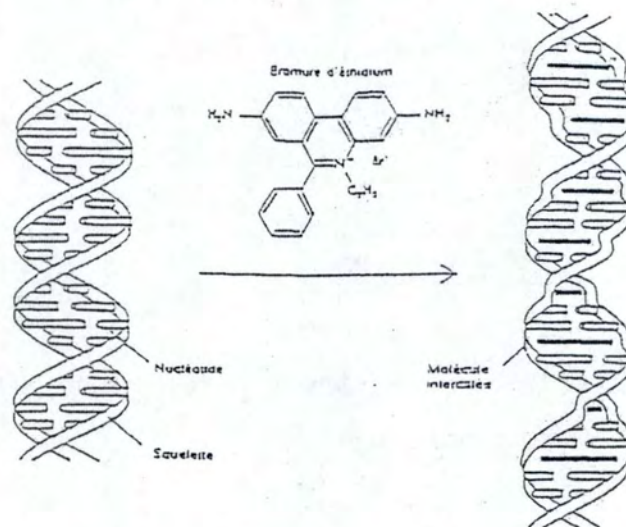


Figure III.2 : Structure et localisation du bromure d'éthidium dans une molécule d'ADN (Watson, 1989).

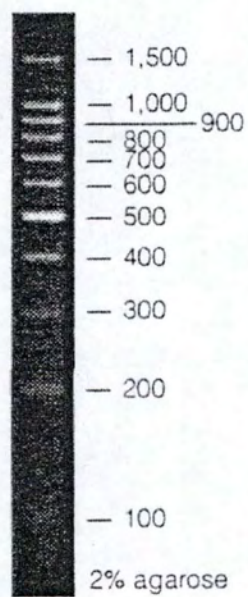


Figure III.3 : Etalon ADN utilisé, 100bp (Promega, Madison, USA)

III.1.3. Electrophorèse en gel d'agarose

Cette étape nous permet de vérifier que les fragments d'ADN ont bien été réamplifiés et d'estimer leur taille, par comparaison avec un étalon ADN.

Un gel d'agarose est soumis à un champ électrique. Les molécules d'ADN chargées sur le gel sont séparées en fonction de leur taille. Le pourcentage en agarose est choisi en fonction de la taille des fragments à séparer. Un gel de faible pourcentage en agarose permet de séparer des fragments d'ADN de grande taille et inversement (figure III.1). La taille des différents fragments peut être estimée grâce à un étalon de poids moléculaire ADN qui migre à côté des échantillons. Cet étalon est constitué de fragments d'ADN de tailles connues. Pour visualiser l'ADN dans le gel, on ajoute une solution de bromure d'éthidium (0,1µg/ml). Il s'agit d'une molécule qui s'intercale dans l'ADN bicaténaire, et devient fluorescente à la lumière U.V. (Figure III.2).

Matériel :

- Cuve d'électrophorèse (Horizon 11-14, Gibco, Paisley, Grande-Bretagne)
- générateur EPS 500/400 (Pharmacia, Suède)
- Appareil photo : Kaiser RA1 + Photo-pront IP-001-SD (Vilber-Lourmat, France)
- Film K65HM (Mitsubishi, Japon) + imprimante P91 (Mitsubishi, Japon)
- Lampe U.V. (Vilber-Lourmat, France)
- TBE 10x (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne)
- Agarose (Ultra Pure Grade Agarose, Bio-Rad, Richmond, USA)
- Bromure d'éthidium (Sigma, St Louis, USA)
- Tampon de charge : 6x Load Dye (Promega, Madison, USA)
- Etalon de poids moléculaire ADN : 100bp (Promega, Madison, USA) (figure III.3)

Méthode :

- Porter à ébullition un volume approprié d'un mélange de TBE 1X et de 0,5 à 2 % d'agarose
- Ajouter le bromure d'éthidium à cette solution.

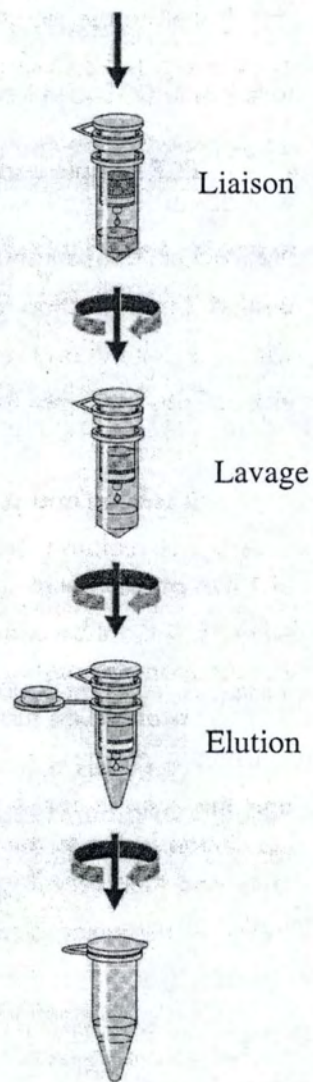


Figure III.4 : Représentation des différentes étapes de la purification d'ADN.

- Couler le gel sur le support *ad hoc* muni de peigne(s) et laisser solidifier.
- Immerger le gel dans la cuve d'électrophorèse remplie de tampon TBE 1X.
- Déposer les échantillons auxquels on a préalablement ajouté le tampon d'échantillon dans les puits du gel.
- Faire migrer à un voltage compris entre 80 V et 120 V. Les fragments d'ADN, chargés négativement, se déplacent vers l'anode, alors que le bromure d'éthidium en excès, chargé positivement, migre vers la cathode.
- Arrêter l'électrophorèse et visualiser les fragments d'ADN sous lumière U.V.
- Photographier le gel.
- Découper les bandes de gel contenant l'ADN.

III.1.4. Purification de l'ADN amplifié

Les fragments d'ADN découpés du gel d'agarose sont purifiés en utilisant des colonnes de silice.

Principe (figure III.4) : en présence d'une concentration élevée en sels et à pH acide, la silice a une forte affinité pour l'ADN. Dans ces conditions, l'ADN va être adsorbé sur la membrane en silice de la colonne de purification alors que les autres constituants du mix PCR seront élués par lavage. L'ADN purifié pourra ensuite être élué de la colonne de purification au moyen d'eau distillée.

Solutions et tampons :

Kit d'extraction d'ADN à partir d'un gel d'agarose QIAEX II (Qiagen, Hilden, Allemagne)

- Tampon de liaison
- Tampon de lavage
- Isopropanol (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Centrifugeuse (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne)
- Bloc chauffant (Techne Dri-Block, DB-2D, Cambridge, Grande-Bretagne)

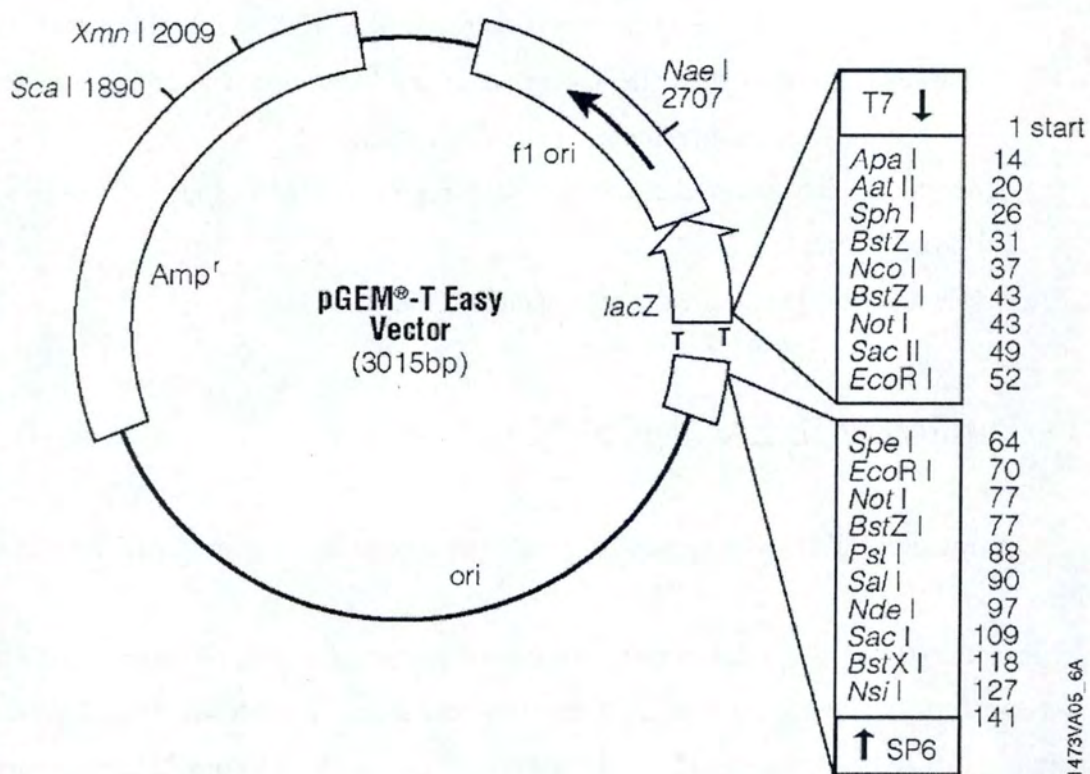


Figure III.5 : Carte génétique du vecteur pGEM-T easy

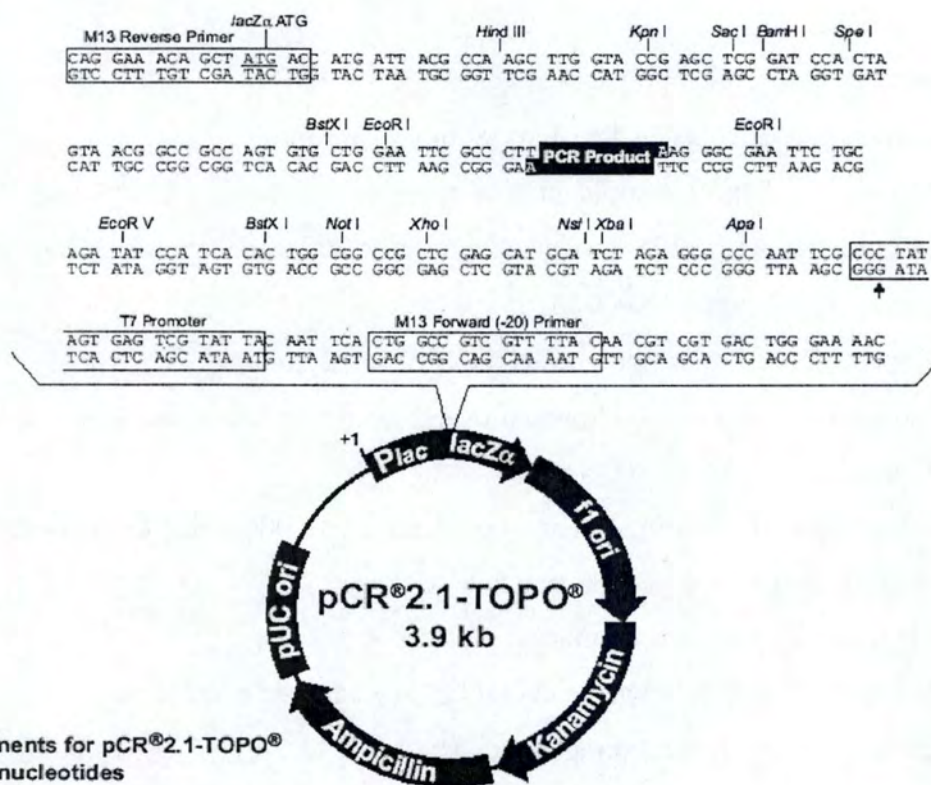
Méthode :

- Ajouter du tampon de liaison (QG) (3 volumes de tampon pour 1 volume de gel) à la tranche d'agarose.
- Incuber 10 minutes à 50°C en vortexant toutes les 2 minutes pour dissoudre l'agarose
- Ajouter 100 µl d'isopropanol et agiter.
- Placer les colonnes de silice dans les tubes appropriés.
- Déposer l'échantillon sur la colonne et centrifuger 1 min à 13.000 rpm.
- Jeter l'éluat et rincer la colonne au moyen de 500 µl de tampon de liaison (QG).
- Centrifuger 1 min à 13.000 rpm.
- Déposer 750 µl de tampon de lavage (PE) sur la colonne.
- Laisser reposer 5 min. à température ambiante avant de centrifuger.
- Centrifuger 1 min. à 13000rpm.
- Jeter l'éluat et centrifuger à nouveau 1 min. à 13.000 rpm (le tampon PE résiduel pourrait interférer avec la liaison de l'ADN).
- Placer la colonne dans un micro-tube propre.
- Déposer 30 µl de tampon d'élution (TE) au centre de la colonne.
- Laisser reposer 1 min à température ambiante.
- Centrifuger 1 min à 13.000 rpm.
- Replacer la solution dans un micro-tube propre annoté.
- Conserver à -20°C.

III.1.5. Plasmides

***pGEM-T Easy* (Promega, Madison,U.S.A.) (figure III.5)**

Ce plasmide, long de 3.015 pb, possède un ADNc codant pour la résistance à l'ampicilline. Il est linéarisé par une endonucléase, ce qui génère des thymidines protrudantes à chaque extrémité 3'. Le fragment d'ADN double brin d'intérêt y est inséré par ligation entre ces thymidines et les adénines protrudantes présentes aux extrémités 3' de l'insert (qui ont été ajoutées par la Taq polymérase lors de la PCR). La séquence codante du gène lac-Z, disruptée lors de la linéarisation, permet la sélection des clones possédant l'insert par un criblage blanc-



Comments for pCR[®]2.1-TOPO[®]
3931 nucleotides

LacZα fragment: bases 1-547
 M13 reverse priming site: bases 205-221
 Multiple cloning site: bases 234-357
 T7 promoter/priming site: bases 364-383
 M13 Forward (-20) priming site: bases 391-406
 f1 origin: bases 548-985
 Kanamycin resistance ORF: bases 1319-2113
 Ampicillin resistance ORF: bases 2131-2991
 pUC origin: bases 3136-3809

Figure III.6 : Carte génétique du vecteur pCR 2.1-TOPO

bleu. Des séquences complémentaires aux amorces M13 sens et anti-sens sont situées de part et d'autre de la séquence lac-Z. Ces séquences sont utilisées à la fois pour cribler les clones positifs, et pour le séquençage.

PCR 2.1-TOPO (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A) (figure III.6)

Ce vecteur de 3,9 kb présente les mêmes caractéristiques que celles décrites ci-dessus pour le pGEM-T Easy. Cependant, le *PCR-TOPO* est lié de manière covalente à une topoisomérase. Celle-ci est libérée après attaque d'un groupement hydroxyl (5'-OH) de l'insert (figure III.7).

III.1.6. Ligation insert-plasmide

Lors de la PCR de réamplification, la Taq-polymérase ajoute des adénines aux extrémités 3' des fragments néo-synthétisés. Ceci leur permet, en présence d'une ligase, de s'attacher aux thymidines présentes aux extrémités 3' du vecteur pGEM-T Easy (ou pCR 2.1-TOPO).

Préparation du mélange réactionnel (pGEM-T Easy) :

La mixture réactionnelle contient :

- T4-ligase (1 µl/tube) (Promega, Madison, U.S.A)
- Tampon de la ligase (dilué 2 fois : 5 µl/tube) (Promega, Madison, U.S.A)
- Vecteur pGEM-T Easy (0.5 µl/tube) (Promega, Madison, U.S.A)
- Le produit PCR (3.5 µl/tube)
- Le mélange de ligation est incubé durant la nuit à 4°C

Préparation du mélange réactionnel (pCR 2.1-TOPO) :

La mixture réactionnelle contient :

- Le produit PCR (4 µl/tube)
- Solution saline (1 µl/tube) : * NaCl 1,2M
* MgCl₂ 60mM

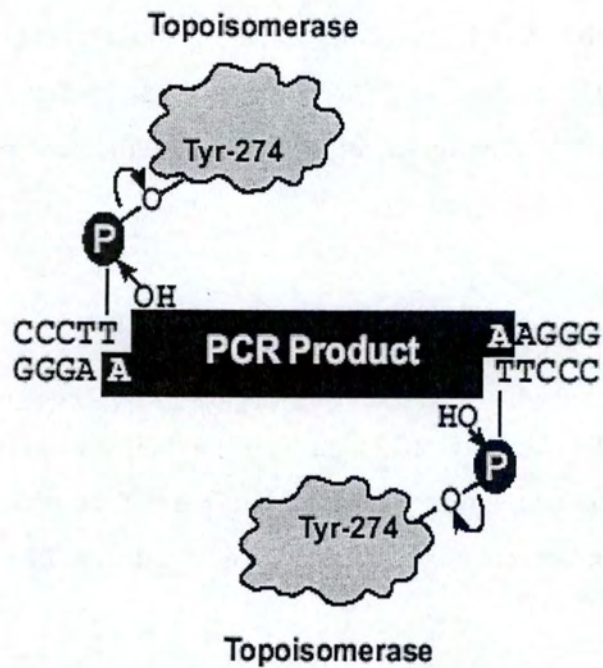


Figure III.7 : Représentation de la Topoisomérase liée de manière covalente au plasmide pCR 2.1-TOPO

- Le mélange TOPO-TA cloning (1 µl/ tube)

Le mélange de ligation est incubé durant 5 min à température ambiante puis placé sur glace afin d'arrêter la réaction.

III.2. Culture bactérienne

III.2.1. Préparation des milieux de culture

Matériel :

- LB Broth (Becton, Dickinson and Company Sparks, Maryland, U.S.A.)
 - Bacto Agar (Difco, Detroit, USA)
 - Glycérol 87% (Merck, Darmstadt, Allemagne)
 - Antibiotiques et autres additifs (X-gal, IPTG, ampicilline à une concentration finale de 100µg/ml) (Sigma, St Louis, USA)
- Incubateur (Innova,)

Méthode :

- Préparer le milieu à 2% de LB broth.
- Autoclaver (25 min à 120°C).
- Laisser refroidir et ajouter les additifs éventuels (antibiotiques, X-gal, IPTG).
- Stocker le milieu à 4°C.

Le milieu LB solide est équivalent au milieu LB liquide auquel on a ajouté 1,5 % d'agar (Difco, Detroit, USA).

- Autoclaver (25 min à 120°C).
- Laisser refroidir dans un bain à 55°C.
- Ajouter ensuite les additifs désirés (X-gal, IPTG, antibiotiques).
- Couler le milieu dans les boîtes de Petri et le laisser solidifier.
- Stocker les boîtes à 4°C.
- Laisser sécher les boîtes de Pétri 30 min sous hotte avant leur utilisation.

III.2.2. Souche bactérienne

E. Coli Sure (Stratagene, La Jolla, USA)

Cette souche bactérienne possède quelques particularités intéressantes :

Elle possède le transposon Tn5 portant le gène de résistance à la kanamycine.

Elle possède une faible quantité d'endonucléases, ce qui permet l'obtention de mini-préparations d'ADN plasmidique de bonne qualité avec un bon rendement.

La souche SURE est incapable de métaboliser le lactose car elle ne possède pas l'opéron lactose.

III.2.3. Culture des bactéries E.Coli Sure

Un stock de bactéries *E.Coli Sure* est conservé à -70°C dans du milieu LB+ kanamycine additionné de 15% de glycérol.

Une fraction de bactéries est prélevée au moyen d'une anse de platine stérile, et est striée sur milieu LB solide+ kanamycine.

Après une incubation d'une nuit à 37°C , une colonie est prélevée stérilement à la surface de la boîte.

III.2.4. Préparation de bactéries compétentes

Les bactéries ne capturent pas naturellement l'ADN plasmidique présent dans leur milieu de culture. Pour réaliser cette opération, on les traite préalablement avec une solution de CaCl_2 de faible force ionique, ce qui provoque la perméabilisation de leurs membranes. Les bactéries ayant subi ce traitement sont dites compétentes.

Ensuite, un choc thermique, réalisé en présence de l'ADN plasmidique, permet à celui-ci d'entrer dans les bactéries compétentes. Ce processus est appelé la transformation bactérienne. Seule une fraction des bactéries va internaliser un plasmide. Ces dernières vont être sélectionnées sur un milieu LB additionné d'un antibiotique auquel elles sont devenues résistantes grâce à l'expression d'un gène de résistance porté par le plasmide.

Matériel :

- Solution de CaCl_2 : - 60 mM CaCl_2 (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- 15 % glycérol (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- 10 mM PIPES pH7 (Sigma, St Louis, USA)
- Centrifugeuse (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne)
- Agitateur (à 37°C) (Innova 4300, New Brunswick Scientific)

Méthode :

- Inoculer une colonie d' E. Coli Sure dans 10 ml de milieu de culture LB additionné d'antibiotiques (kanamycine).
- Incuber la culture une nuit à 37°C sous agitation modérée.
- Inoculer 2 x 200 ml de milieu LB (avec antibiotique - kanamycine) avec 2 x 2 ml de préculture et laisser pousser à 37°C sous agitation modérée jusqu'à ce que la densité optique à 590 nm de la culture atteigne 0,6 à 0,8.
- Incuber sur glace pendant 10 min pour arrêter la croissance de la culture.
- Centrifuger à 4°C pendant 7 min à 4.000 rpm (Beckman J-21B, rotor JA-14).
- Resuspendre les culots dans 20 ml d'une solution de CaCl_2 à 4°C.
- Incuber 30 min sur glace.
- Mélanger les deux solutions.
- Centrifuger à 4°C pendant 5 min à 4000 rpm.
- Resuspendre le culot dans 8 ml de solution CaCl_2 à 4°C.
- Aliquoter sur glace (par 200µl) et conserver à -70°C ou utiliser directement pour une transformation.

III.2.5. Transformation bactérienne par choc thermique

Méthode :

- Dégeler sur glace les bactéries CaCl_2 compétentes.
- Ajouter toute la préparation plasmidique aux bactéries.
- Laisser reposer 10 min sur glace.

- Placer le mélange 2 min à 42 °C pour réaliser le choc thermique.
- Ajouter du milieu LB (avec ampicilline) à la suspension bactérienne.
- Incuber pendant 30 min à 37°C sous agitation (250 rpm).
- Etaler sur un milieu solide sélectif ((IPTG 40 µg/ml (Promega, Madison, U.S.A.); X-gal 80 µg/ml (Promega, Madison, U.S.A.); Ampicilline (Sigma, St-Louis, U.S.A.)).
- Incuber pendant une nuit à 37°C.

III.2.6. Minicultures :

- Préparer des tubes de 2.5 ml avec du milieu L.B. liquide + antibiotique (ampicilline).
- Prélever une colonie.
- Inoculer dans le milieu LB.
- Placer les tubes dans l'agitateur à 37°C durant la nuit.

III.3. Identification des fragments d'intérêt

III.3.1. Criblage par PCR

III.3.1.a. Préparation du mélange réactionnel

Appareil PCR utilisé : Perkin Elmer, Gene amp, PCR system 2400

La mixture réactionnelle contient:

- Amorces M13 sens et anti-sens [64nM] (Eurogentec, Liege, Belgique)
- dNTP Master Mix [12,5 µM] (Eurogentec, Liège, Belgique)
- Tampon de la polymérase (Biotools, B& M Labs, Spain)
- Taq Polymérase 1U (Biotools, B& M Labs, Spain)
- Eau distillée
- Bactéries à cribler

III.3.1.b. Conditions des cycles PCR

Les conditions de PCR sont les suivantes :

- 94°C pendant 10 min
- 25 cycles : 94°C pendant 30 sec
50°C pendant 15 sec
72°C pendant 1 min
- 72°C pendant 10 min

III.3.1.c. Visualisation sur gel d'agarose

Le principe est similaire à celui décrit dans la partie « PCR de réamplification ». Les produits PCR sont chargés sur un gel d'agarose 2%. La migration se fait durant environ 1h30 à 100V en présence d'un étalon de poids moléculaire. Le gel est photographié à la fin de la migration.

III.3.2. Minipréparation d'ADN plasmidique

Les principales étapes de cette technique sont les suivantes :

- Lyse alcaline des bactéries.
- Séparation de l'ADN des autres macromolécules.
- Précipitation alcoolique de l'ADN plasmidique.
- Lavage de l'ADN plasmidique.
- Resuspension de l'ADN plasmidique.

Solutions et tampons

(Kit « Qiagen plasmid purification » (Qiagen, Hilden, Allemagne)

- Tampon P1 : (tampon de resuspension)
 - 50 mM Tris-HCl pH 8,0
 - 10 mM EDTA
 - 100 µg/ml RNase A (Conservation à 4°C après avoir ajouté la RNase A)
- Tampon P2 : (tampon de lyse)

200 mM NaOH 0,1 % SDS (Conservation à température ambiante)

- Tampon P3 : (tampon de neutralisation)

3 M d'acétate de potassium pH 5,5 (Conservation à 4°C)

- Isopropanol (Merck, Darmstadt, Allemagne) conservé à -20°C

- Ethanol absolu (Merck, Darmstadt, Allemagne)

Méthode:

- Prélever stérilement une fraction de la culture liquide et conserver le reste à -70°C après ajout de 15% de glycérol.
- Centrifuger pendant 5 min à 15.000 rpm à 4°C (Heraus Sepatech, Biofuge 17 RS, rotor 1.379) et éliminer le surnageant.
- Resuspendre le culot de bactéries dans 200 µl de tampon P1.
- Ajouter 200 µl de tampon P2 et mélanger doucement (lyse cellulaire).
- Incuber 5 min à température ambiante.
- Ajouter 200 µl de tampon P3 et mélanger doucement.
- Incuber 15 min sur glace.
- Centrifuger 15 min à 15.000 rpm à 4°C (Heraus Sepatech, Biofuge 17RS, rotor 1.379) et récupérer le surnageant.
- Laver l'ADN au moyen de phénol-chloroforme-alcool isoamylique
- Centrifuger 15 min à 15.000 rpm à 4°C.
- Reprendre la phase aqueuse et ajouter 20% d'éthanol absolu.
- Incuber 5 min à température ambiante.
- Centrifuger 10 min à 15.000 rpm à 4°C et décanter.
- Laver l'ADN au moyen d'éthanol 70%.
- Centrifuger pendant 15 min à 15.000 rpm à 4°C.
- Éliminer l'éthanol en le laissant s'évaporer.
- Resuspendre le culot dans l'eau + RNase A (1/1000).
- Prélever une fraction pour le dosage au spectrophotomètre et conserver le reste à -20°C.
- Doser la concentration en ADN aux longueurs d'onde de 260 nm et 280 nm. Toutes les mesures sont effectuées en double. À partir de là, il est possible de déterminer le volume à prélever pour obtenir une concentration finale de 700

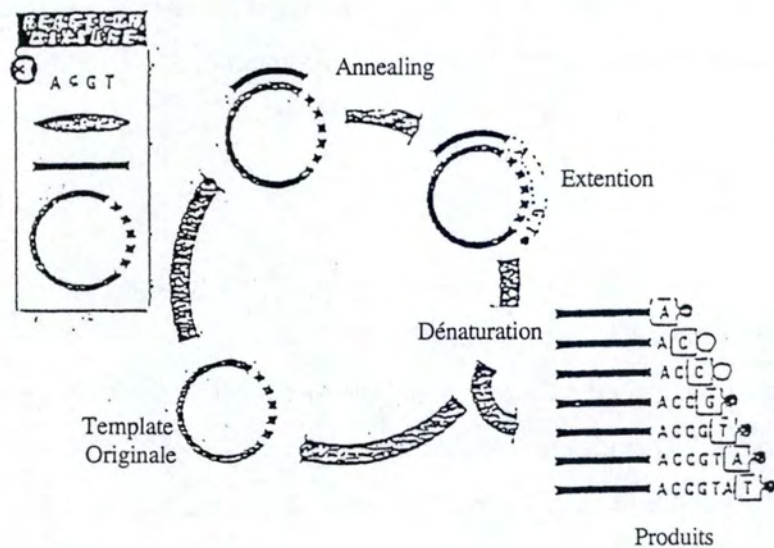


Figure III.8 : PCR de séquençage à fluorescence.

Au cours des cycles PCR, l'élongation des fragments cibles est inhibée par l'incorporation d'un nucléotide couplé à un fluorochrome. On obtient des amplicons de taille différentes dont le dernier nucléotide incorporé est marqué. Après migration sur gel, la distribution de fluorescence est étudiée.

ng/ml, afin de se trouver dans les conditions optimales pour la PCR de séquençage.

III.3.3. Le séquençage

Les réactions de séquençage d'ADN plasmidique ont été réalisées au sein du département de neurobiologie aux FUNDP. La technique utilisée repose sur l'incorporation de nucléotides fluorescents par PCR. Les amorces universelles M13 sens, et M13 anti-sens ont été utilisées (figure III.8).

III.4. Culture de fibroblastes WI-38

Dans le cadre de ce travail, nous avons utilisé des fibroblastes de la souche WI-38, à savoir des fibroblastes pulmonaires fœtaux d'origine humaine. Ces cellules proviennent de l'American Type Culture Collection (Manassas, VA). Elles ont été initialement mises en culture par Hayflick (Hayflick *et al.*, 1961).

III.4.1. Culture des fibroblastes WI-38 :

Matériel :

- BME + 10 % FBS : Milieu BME additionné de 10 % de sérum de veau fœtal (FBS)(Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- Milieu de congélation : Milieu BME additionné de 10 % de Diméthylsulfoxyde (DMSO) et de 20 % de FBS. Le DMSO est un agent cryoprotecteur utilisé lors de la congélation des cellules (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Milieu de rinçage : PBS (Phosphate Buffer Saline, 10mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4)
- Trypsine : Solution de trypsine à 0,25 % (Gibco,V,P)
- Boîtes de culture stériles de 25 cm² (T25) ou 75 cm² (T75) (Corning, Cambridge, U.S.A.)
- Antibiotiques : Peniciline-Streptavidine (Bio-Whitaker, Verviers, Belgique)

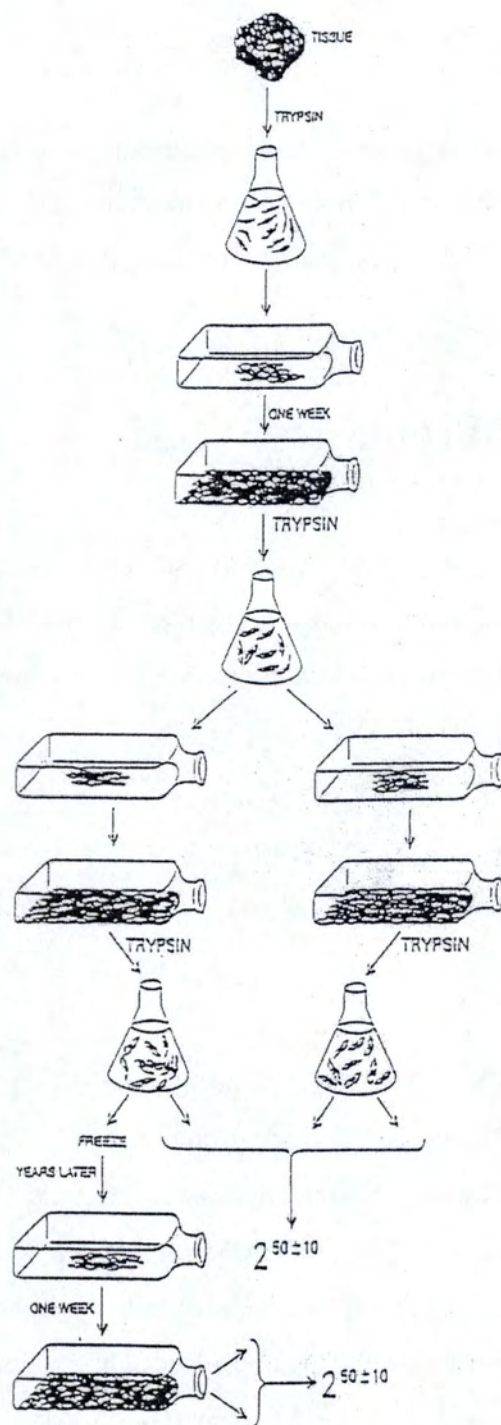


Figure III.9 : Schéma représentant le principe de culture cellulaire sériée (Hayflick, L. et Moorhead, P.S., 1961)

III.4.1.a. Repiquage des fibroblastes WI-38 :

Les cellules sont maintenues en culture selon la méthode classique décrite par Hayflick (Hayflick *et al.*, 1961). (Figure III.9)

Elles sont cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm² (T75). Quand elles sont à confluence, soit quand elles atteignent la densité moyenne de 40.000 cellules par cm², elles sont repiquées dans des conditions stériles.

- Préchauffer à 37 °C le milieu de rinçage, le milieu de culture (BME + 10 % FBS) et la solution de trypsine.
- Décanter la boîte et rincer les cellules avec 10 ml de milieu de rinçage. Ce lavage permet d'éliminer toute trace de sérum qui pourrait inhiber l'action de la trypsine.
- Ajouter 2 ml de trypsine par T75 pendant environ 1 min. La trypsine permet de digérer la matrice extra-cellulaire.
- Décanter l'excédent de trypsine et incuber les cellules à 37°C pendant environ 5 min (jusqu'à ce que les cellules deviennent rondes et se détachent).
- Verser 9 ml de BME + 10% de FBS dans la T75 et rompre les agrégats cellulaires à l'aide d'une pipette Pasteur.
- Après homogénéisation, répartir les cellules en 2 ou 4 boîtes et ajouter du BME + 10% de FBS afin d'obtenir un volume final de 15 ml par T75.
- Placer les boîtes de culture entrouvertes dans une étuve à 37°C avec 5% de CO₂.

III.4.1.b. Congélation des fibroblastes WI-38 :

Afin de conserver des cellules à un stade donné de leur développement, elles sont congelées dans de l'azote liquide.

- Rincer et trypsiniser les cellules comme lors d'un repiquage.
- Ajouter 9 ml de BME + 10 % FBS.
- Centrifuger 10 min à 1.000 rpm (centrifugeuse Hettich Universal, Tuttlingen, Allemagne).
- Éliminer le surnageant et resuspendre les cellules dans 1 ml de milieu de congélation.
- Transférer la solution dans un cryotube (Corning, Cambridge, USA).

- Placer le cryotube dans 2 tubes (10 ml (Becton Dickinson, Cowley, Grande-Bretagne) et 50 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Allemagne)) fermés hermétiquement et qui sont plongés dans une bouteille d'éthanol absolu à température ambiante.
- La bouteille est alors placée dans un congélateur à -70°C (cela afin de diminuer progressivement la température jusqu'à -70°C).
- Après minimum 12 h, le cryotube est plongé dans de l'azote liquide à -196°C .

III.4.1.c. Décongélation des fibroblastes WI-38 :

- Plonger le cryotube dans un bain à 37°C .
- Une fois les cellules décongelées, centrifuger pendant 10 min à 1000 rpm.
- Décanter le surnageant (qui contient du DMSO, toxique pour les cellules).
- Resuspendre le culot cellulaire dans du BME + 10% FBS et le transférer dans une nouvelle boîte de culture.
- Porter à 15 ml avec du BME + FBS 10%.
- Le lendemain, le milieu de culture des cellules est renouvelé afin d'éliminer toute trace de DMSO.

III.4.2. Stress successifs:

Les stress subcytotoxiques sont effectués à raison d'une (t-BHP) ou deux (EtOH) heures par jour pendant 5 jours consécutifs. Ils sont suivis de 2 jours de récupération avant extraction de l'ARN ou des protéines. Ceci nous permet d'observer les effets à long terme des stress .

Matériel.:

- Milieu de rinçage : PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9 %, pH 7,4)
- BME + 10 % FBS: Milieu BME additionné de 10 % de sérum de veau fœtal (Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- *tert*-butylhydroperoxyde (Merck, Darmstadt, Allemagne) Stock à 7.92 M
- Ethanol absolu (Merck, Darmstadt, Allemagne)

Méthode :

- Les dilutions d'éthanol ou de t-BHP dans le milieu de culture (BME +10% FBS) sont préparées juste avant les stress.
- Décanter l'ancien milieu.
- Ajouter 10 ml de milieu additionné de 5% d'EtOH ou de 90 μ M de t-BHP.
- Incuber les cellules durant 1 ou 2 h, selon qu'il s'agit respectivement du t-BHP ou de l'EtOH.
- Rincer les cellules avec 10 ml de PBS.
- Replacer 10 ml de BME + FBS 10% dans chaque boîte.
- Placer les cellules dans l'étuve à 37°C avec 5% de CO₂.

En parallèle, des boîtes de cellules contrôles subissent les mêmes changements de milieu, mais sans molécule stressante.

III.5. Détection des biomarqueurs de la sénescence

III.5.1. Activité SA- β -gal

Matériel

Solution de fixation :

- Formaldéhyde 2 % (Belgolabo, Belgique).
- Glutaraldéhyde 0,2 % (Fluka, Pays-Bas).
- PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9%, pH 7,4).

Solution de coloration :

- NaCl 150 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne);
- Tampon hydrogenophosphate de sodium 40 mM pH6,0 :
 - NaH₂PO₄ (Merck, Darmstadt, Allemagne),
 - Na₂HPO₄ (Merck, Darmstadt, Allemagne),
- Ferrocyane de Potassium 5mM (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Ferricyane de Potassium 5 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- MgCl₂ 2 mM (Merck, Darmstadt, Allemagne).

- 1 mg/ml de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (x-gal) (Eurogentec, Seraing, Belgique). Solution stock à 20 mg/ml dilué dans du N, N' diméthylformamide (Janssen Chimica, Belgique) conservé à -20°C .

Traitement des cellules

- Méthanol (Acros Organics, New Jersey, U.S.A.).
- PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9%, pH 7,4).

Méthode

- 48 heures après le dernier stress, repiquer les cellules à faible densité (1000 cellules/cm²) dans de petites boîtes de pétri (diamètre = 35 mm).
- Le lendemain, décanter le milieu de culture des cellules.
- Rincer 2x avec du PBS.
- Fixer les cellules 5 min dans la solution de fixation.
- Rincer 2x avec du PBS.
- Incuber avec 2 ml de solution de coloration pendant 12 à 16 heures à 37°C et sans CO_2 .
- Quand la coloration est nette, rincer les cellules 2x au PBS, puis les sécher au méthanol.
- Déterminer la proportion de cellules positives pour l'activité SA β -gal (bleues) par rapport aux cellules ne possédant pas cette activité.

III.5.2. Incorporation de la [^3H]-thymidine

Matériel

- NaOH 0,5M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- HCl 0,5M (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Acide trichloroacétique (TCA) 10 % (SDS, France)
- Ethanol 70% (SDS, France)
- Trypsine 0,25 % (Gibco, Paisley, Grande-Bretagne)

- BME (Basal Medium Eagle, Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- FBS (Sérum de veau fœtal, Gibco BRL, Paisley, Grande-Bretagne)
- PBS (Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9%, pH 7,4)
- Thymidine tritiée (NEN, Boston, USA)
- Aqualuma (Lumac, Pays-Bas)
- Compteur à scintillations (modèle 2100TR Packard Instrument Company, Meriden, U.S.A.)

Méthode

- 24 heures après le dernier stress, les cellules sont repiquées à une confluence de 10.000 cellules/puit dans une plaque 24-puits dans du milieu BME + 1 % FBS additionné de 1 μ Ci/ml de thymidine tritiée.
- Les boîtes sont ensuite incubées 48 h dans une étuve à 5 % CO₂ afin de permettre l'incorporation de thymidine tritiée.
- Les boîtes sont rincées 2x avec 1 ml de PBS. Puis elles sont rincées 1x avec 1 ml de TCA 10% (préalablement refroidi sur glace), 1x à l'éthanol 70 % et 1x au PBS.
- Ensuite, 250 μ l de NaOH 0,5 M leur sont ajoutés. Après 30 min, la réaction est neutralisée en ajoutant 250 μ l d'HCl 0,5 M.
- Après homogénéisation à la pipette Pasteur, les 500 μ l de lyse sont repris dans une fiole contenant 5 ml d'Aqualuma. La fiole est ensuite agitée et placée dans le compteur à scintillation.

III.6. Quantification relative du taux de transcrits

III.6.1. Préparation de l'ARN

III.6.1.a. Extraction d'ARN

Matériel :

Solutions provenant du kit RNAgents Total RNA Isolation System (Promega, Madison, USA):

- Solution de dénaturation (thyocyanate de guanidine et tampon citrate / sarcosine / β -mercaptoéthanol)
- Acétate de sodium 2 M pH4,0
- Phénol / Chloroforme / alcool isoamylique en proportions 125 : 24 : 1, pH 4,3-4,7
- Isopropanol
- Eau distillée sans nucléase
- EtOH 75% (Merck, Darmstadt, Allemagne)
- Milieu de rinçage : PBS (Phosphate Buffer Saline, 10mM, NaCl 0,9%, pH 7,4)

Méthode

- Rincer les cellules au PBS, 4°C.
- Lysér les cellules directement dans la boîte de culture au moyen de la solution de dénaturation.
- Ajouter 1/10 volume d'acétate de sodium 2 M (pH 4,0)
- Ajouter 1 volume de Phénol / Chloroforme / alcool isoamylique.
- Mélanger par inversion .
- Incuber 15 min sur glace.
- Centrifuger à 4°C durant 20 min à 12.000 rpm.
- Récupérer délicatement la phase aqueuse qui contient l'ARN.
- Ajouter un volume d'isopropanol et incuber à - 20°C pendant \pm 30 min pour précipiter l'ARN.

- Centrifuger à 4°C durant 15 min à 12.000 rpm.
- Resuspendre le culot dans la solution de dénaturation.
- Ajouter 1 volume d'isopropanol et mettre à -20°C pendant +/- 30 min pour précipiter l'ARN.
- Centrifuger le reste à 4°C durant 15 min à 12.000 rpm.
- Laver le culot avec de l'EtOH 75% à 4°C.
- Laisser sécher l'ARN.
- Resuspendre l'ARN dans de l'eau distillée
- Prélever une fraction pour le dosage au spectrophotomètre.
- Conservez le reste à -70°C.

III.6.1.b. Dosage de l' ARN

Diluer 0.7 µl d'ARNm dans 70 µl d'H₂O pour doser la concentration au spectrophotomètre (mettre à 4°C pendant le dosage). La concentration est obtenue en lisant la densité optique à 260 nm (1 DO = 40 µg /ml d'ARN). L'absorbance est également lue à 230 nm et 280 nm. Le rapport $A_{260 \text{ nm}} / A_{280 \text{ nm}}$ donne une indication de la pureté de l'ARN. Il se situe idéalement entre 1.7 et 2.0. Le rapport $A_{260 \text{ nm}} / A_{230 \text{ nm}}$ doit lui, se situer entre 1.5 et 2.0. S'il est trop faible, il témoigne de la présence résiduelle de thiocyanate de guanidine.

III.6.2. PCR en temps réel

Nous utilisons ici la PCR en temps réel pour vérifier les différences de niveau d'expression de cinq gènes sélectionnés après séquençage, lors de la SIPS induite par le t-BHP ou l'éthanol : Ancient Ubiquitous Protein 1 (AUP1), BIRC-6, Insulin-Like growth Factor Receptor II (IGFR-2), KIAA1501 et la carnitine palmitoyl transférase (CPTI).

Principe:

L'appareil utilisé (ABI Prim 7000, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) permet une analyse simultanée des 96 puits. Après excitation par un faisceau laser, la détection de la fluorescence induite par le SYBR GREEN lors des cycles PCR est détectée par un spectrophotomètre entre 500 nm et 660 nm (Bustin, 2000). Les résultats sont traités et

visualisés sur ordinateur grâce au logiciel ABI PRISM 7000 SDS (Sequence Detection System) Software (Applied Biosystem, UK).

L'analyse des résultats se déroule en deux étapes. Tout d'abord, il faut déterminer le seuil de détection au dessus duquel l'intensité de fluorescence est significativement différente du bruit de fond. Le Ct (cycle seuil ou « threshold cycle », cycle auquel la courbe d'amplification croise le seuil de détection) est inversement proportionnel à la quantité d'ADNc cible de départ.

L'analyse des différences d'expression d'un gène dans les conditions étudiées se fait par comparaison avec le niveau d'expression d'un gène de référence dans ces mêmes conditions. Ce gène de référence est choisi de manière à ce que son taux de transcrits reste stable dans les conditions étudiées. Dans ce travail, ce gène de référence est le gène codant pour la 23kDa Highly Basic Protein.

III.6.3. Transcription inverse

Matériel :

- ARN issu des cellules WI-38 contrôles, jeunes, sénescents, en SIPS après stress au t-BHP, ou à l'éthanol
- Oligo-dT (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- Tampon pour la Superscript-II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- DTT 0,1 M (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- RNAsin (40 U/ μ l) (Promega, Madison, USA)
- dNTP mix 250 μ M (Eurogentec, Liège, Belgique)
- SuperScriptII (200 U/ μ l) (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- RNase H (2 U/ μ l) (Invitrogen, Carlsbad, USA)
- Centrifugeuse (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne)

Méthode :

- Mélanger 2 μ g d'ARN à 1 μ g d'oligo-dT.
- Incuber 10 min à 70°C.
- Incuber 5 min sur glace.

- Ajouter 9 µl de mélange de réaction composé de : - Tampon pour la Superscript II
- DTT 0,1 M
- RNAsin (40 U/µl)
- dNTP mix
- Incuber 5 min à température ambiante.
- Ajouter 300 U de SuperScriptII.
- Incuber 1h30 à 42°C.
- Incuber 15 min à 70°C pour neutraliser la Super Script II.
- Ajouter 2 U de RNase H.
- Incuber 20 min à 37°C pour dégrader le brin d'ARN.
- Conserver à -20°C.

III.6.3.a. PCR en temps réel :

Des mises au point précèdent la détermination du niveau de transcrits du gène d'intérêt. Tout d'abord, en établissant une droite standard pour chaque gène d'intérêt et le gène de référence, on s'assure que les efficacités de PCR sont comparables pour tous. C'est une condition nécessaire pour la normalisation des résultats. Ensuite, une courbe de dissociation réalisée en fin de PCR permet de déterminer la nature du produit de la PCR. Ce produit PCR est également visualisée sur gel d'agarose.

Choix des amorces :

Le logiciel « Primers Express 1.5, PE Applied Biosystems » permet de choisir une paire d'amorces optimales pour la réaction PCR en temps réel.

Les amorces choisies doivent avoir les caractéristiques suivantes :

- Une température de melting comprise entre 58°C et 60°C.
- Ne pas contenir quatre répétitions d'une même base.
- Ne pas contenir plus de deux "G" ou deux "C" dans les cinq bases situées à l'extrémité 3'
- Permettre l'amplification d'un fragment d'une taille comprise entre 50 et 150 pb.

Tableau III.1: Nom du gène amplifié par PCR en temps réel, séquence des amorces sens et anti-sens utilisées, température de fusion des amorces et de l'amplicon, et longueur de l'amplicon généré lors de la real-time PCR.

Nom gène	Amorce sens	Amorce anti-sens	Tm amorce sens	Tm amorce anti-sens	Longueur amplicon	Tm
BIRC-6	GCAGCTCTCAAGCGTCACACT	TTAGAGTCTCCTCAGCACCTGTTG	59	59	133 bp	83
AUP1	CGCAAGAAGGAGATTCACAGAGA	GGGTGCCATCCTGTTCCTTT	60	60	70 bp	83
IGFII-R	GTTCCAACGTGTCCTACAAATACTCA	GTGGAGGAGGCAGCTGGAT	59	59	102 bp	75
CPT1	CCAAGGCCTCAATGACATCC	TGGCAATTTACCCCTTATTCCT	59	58	83 bp	82
KIAA1501	CAGCGGACCTGTTGGAGATT	GGGCGTACGGCTCCTTCT	59	59	92 bp	83

Détermination de l'efficacité de PCR :

Différentes dilutions (de 10^{-1} à 10^{-4}) de l'ADNc de départ sont effectuées afin de déterminer l'efficacité de la PCR. À partir des Ct obtenus pour chaque dilution en ADNc de départ, une droite de régression est tracée. La pente permet de déterminer l'efficacité de la PCR ($E = -1/\text{pente}$). Les efficacités d'amplification du gène d'intérêt et du gène de référence doivent être comparables pour permettre la normalisation.

Quantification de l'expression des gènes BIRC-6, KiAA1501, AUP-1, CPT1 et IGFR2.

En parallèle, l'expression du gène de référence (23 kDa HBP) est quantifiée dans les mêmes conditions.

Matériel :

- SYBR Green PCR Master Mix (Syber Green, Amplitaq Gold polymérase, dNTP, buffer 2x) (Applied Biosystems, UK)
- Amorces sens et anti-sens (Applied Biosystem UK)(Tableau III.1)

Méthode :

- Préparation du master mix : * SYBR Green PCR Master Mix:12,5 μ l
 - * Amorces sens : concentration finale [900 nM]
 - * Amorces anti-sens : concentration finale [900 nM]
 - * ADNc matrice dilué 100x
 - * ddH₂O
 - Conditions PCR :
 - 50°C durant 2 min
 - 95°C durant 10 min
 - 40 cycles : * 95°C durant 15 sec (étape de dénaturation)
 - * 60°C durant 1 min (étapes d'hybridation et d'élongation)
- (Gradient de température de 60°C à 95°C (pour la courbe de dissociation))

III.7. Quantification relative du taux de protéines

III.7.1. Préparation des extraits protéiques

III.7.1.a. Extraction protéique

Matériel :

- Tampon de lyse SDS 2% (ICN Biomedicals, Ohio, USA)
 Glycérol 10% (Merck, Darmsdadt, Germany)
 DTT 50 mM (Sigma, St Louis, USA)
 Bleu bromophénol 0,1% (Janssen Chilmica, Beerse, Belgique)
 Tris-HCl pH6,8 (ICN Biomedicals, Aurora, Ohio)
- PBS (milieu de rinçage) : Phosphate Buffer Saline, 10 mM, NaCl 0,9%, pH 7,4

Méthode :

- Rincer 2 fois les cellules avec du PBS (10 ml / T75 ou 5 ml / T25).
- Décanner complètement le PBS et poursuivre l'extraction en laissant les boîtes sur glace.
- Verser le tampon de lyse sur les cellules (500 µl / T75 ou 200 µl / T25).
- Répartir le tampon de lyse sur tout le tapis cellulaire.
- Racler les cellules au moyen d'un grattoir .
- Transvaser les extraits protéiques dans un microtube annoté (toujours sur glace).
- Soniquer 30 sec sur glace.
- Conserver les extraits protéiques à -70°C .

III.7.1.b. Méthode inverse :

Principe :

La concentration en protéines dans les différents extraits préparés à partir des cellules WI-38 est déterminée par la méthode inverse. Cette méthode a été choisie en raison de la présence de DTT (agent réducteur) dans le tampon de lyse. Les autres méthodes ne sont pas compatibles avec notre tampon de lyse. Après avoir été précipitées, les protéines sont resuspendues dans une solution contenant du cuivre, dont une partie se lie aux protéines. Elles sont mises ensuite en présence de la solution de coloration. L'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en cuivre libre et est donc inversement proportionnelle à la concentration en protéines. En rapportant les valeurs de DO obtenues pour les échantillons à celles obtenues pour des solutions d'albumine de sérum bovin de différentes concentrations connues (droite de calibration), nous pouvons déterminer la concentration en protéines de chaque échantillon.

Matériel :

Kit « PlusOne 2-D Quant Kit (Amersham Pharmacia Biotech, San Francisco, U.S.A)
contenant la solution standard : albumine de sérum bovin

- Centrifugeuse (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne)
- Spectrophotomètre (Uvikon 930, Kontron instruments)

Méthode :

- Préparer la solution de révélation : 1% de solution B dans la solution A.
- Préparer les échantillons : * centrifuger à 13.000 rpm pendant 10 min.
* diluer les échantillons de manière à obtenir entre 0,5 et 50µg de protéines par tube. Réaliser des duplicats pour chaque échantillon.
- Préparer également les échantillons pour la droite de calibration (0 ; 0,2 ; 0,4 ou 0,8 mg/ml d'albumine de sérum bovin diluée dans du tampon de lyse).
- Ajouter 500 µl de précipitant .
- Vortexer brièvement et incubé les tubes 2 à 3 min à température ambiante.

- Ajouter 500 µl de co-précipitant et mixer brièvement par inversion.
- Centrifuger à 13.000 rpm pendant 5 min de manière à sédimenter les protéines.
- Décanter le surnageant à la pipette pasteur.
- Centrifuger à 13.000 rpm.
- Décanter le surnageant résiduel.
- Ajouter 100 µl de solution de cuivre.
- Ajouter 400 µl d'eau distillée.
- Vortexer brièvement pour redissoudre les protéines.
- Ajouter 1ml de solution de coloration.
- Mélanger.
- Incuber 15 à 20 min à température ambiante.
- Lire l'absorbance à une longueur d'onde de 480 nm.

Cette absorbance doit être lue dans les 40 min qui suivent l'addition de solution de coloration. En effet, l'intensité de cette coloration suit une phase exponentielle avant d'atteindre une phase plateau. Il faut réaliser la quantification lors de cette phase exponentielle.

III.7.2. Western blot

Principe :

Les protéines qui sont extraites d'une population cellulaire déterminée sont déposées sur un gel de polyacrylamide. Il est constitué d'un gel d'empilement dans lequel les échantillons sont condensés et d'un gel de séparation qui permet de séparer les protéines en fonction de leur poids moléculaire. Le pourcentage en acrylamide du gel est choisi en fonction du poids moléculaire des protéines d'intérêt. Un étalon de poids moléculaire est chargé sur une piste de gel. Il est constitué d'une série de protéines de taille connue et permet donc de déterminer la taille de la ou des protéines détectées. Après migration, les protéines contenues dans le gel sont transférées sur une membrane de polyvinylidène difluoride (PVDF). Cette membrane est incubée en présence de lait de manière à saturer les sites de liaison non-spécifiques. Ceci permet d'éviter la liaison non-spécifique des anticorps lors de l'étape de détection. La membrane est alors incubée avec l'anticorps primaire. Ensuite l'anticorps secondaire, dirigé contre le fragments Fc de l'anticorps primaire, est mis en contact avec la



Protéines

Poids moléculaires approximatifs (kDa) (Système SDS-Page)


	Tris- Glycine	Tricine	NuPAGE® MES	NuPAGE® MOPS	NuPAGE® Tris-Acetate
 Myosin	250 kDa	210 kDa	188 kDa	191 kDa	210 kDa
Phosphorylase B	148	105	98	97	111
BSA	98	78	62	64	71
Glutamic Dehydrogenase	64	55	49	51	55
Alcohol Dehydrogenase	50	45	38	39	41
Carbonic Anhydrase	36	34	28	28	n/a
Myoglobin Red	22	17	17	19	n/a
Lysozyme	16	16	14	14	n/a
Aprotinin	6	7	6	n/a	n/a
Insulin, B Chain	4	4	3	n/a	n/a

Figure III.10 : Etalon de poids moléculaire utilisé lors des Western blot:
SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)

membrane. Il est couplé à la peroxydase de raifort (HRP). La révélation s'effectue ensuite grâce à une solution contenant le substrat de la peroxydase (H_2O_2) et du luminol qui émet des photons lorsqu'il est oxydé. Ceux-ci permettent l'impression d'un film autoradiographique qui est placé en contact avec la membrane.

Matériel :

- Extraits protéiques de fibroblastes WI-38
- Centrifugeuse (Biofuge pico, Heraeus, Allemagne)
- Minigel (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)
- Tampon de migration : tampon MOPS (20x) (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)
- Cuve d'électrophorèse (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)
- Etalons de poids moléculaire :
 - SeeBlue Plus2 Pre-Stained Protein Standard (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A) (figure 10)
 - Prosieve color protein markers (BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, USA)
 - Magicmark western standard (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A)
- Eponges
- Papiers whatman (Merck, Darmstadt, Allemagne).
- Membrane de PVDF (Amersham Pharmacia Biotech UK Limited, Uppsala, Suède)
- Tampon de transfert :
 - * tampon de transfert NuPage (20x) (Invitrogen, Carlsbad, U.S.A).
 - * méthanol (10% pour 1 gel ; 20% pour deux gels)
- Générateur (Biorad Power PAC 300)
- Tampon de rinçage (TBS-Tween) :
 - * TBS (100x)
 - * Tween 20 (1000x) (Polyoxyéthylènesorbitan monolaurate) (Sigma, St Louis, USA)
 - * porter à volume avec de l'eau distillée
 - (* lait écrémé (5%) (Gloria, Nestlé, Belgique))
- Anticorps primaires :

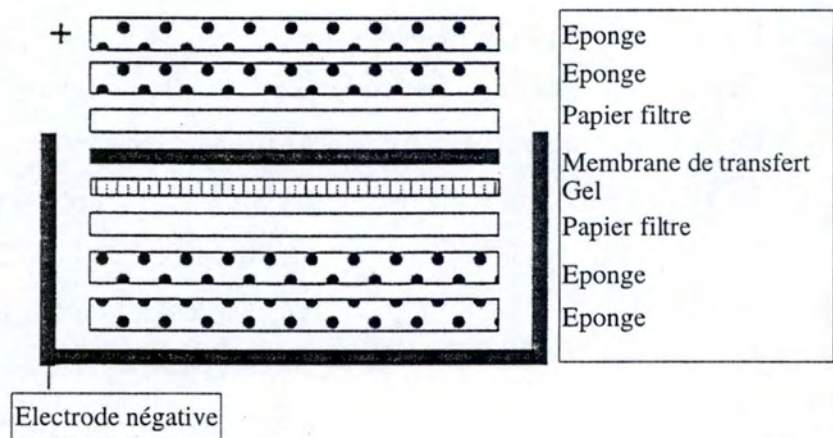


Figure III.11 : Représentation schématique du système « en sandwich » utilisé pour le transfert des protéines du gel de polyacrylamide sur la membrane de PVDF.

- * IgG anti-clusterin- β : IgG polyclonales de chèvre (300x) (Santa Cruz Biotechnology,)
- * IgG anti-AOP2 : IgG polyclonale de lapin (5000x) (Fisher, université de Pennesylvanie, USA)
- * IgG anti-tubuline : IgG polyclonale de souris (2000x) (InnoGenex, San Ramon, USA)

- Anticorps secondaires :
 - * IgG de lapin anti-chèvre couplée à la peroxydase (4000x) (Dako, Danemark)
 - * IgG de chèvre anti-souris couplée à la peroxydase (4000x) (Dako, Danemark)
 - * IgG de singe anti-lapin (4000x) (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, Grande-Bretagne)

- Substrat de révélation :
 - * Western lightning chemoluminescence reagent plus (PerkinElmer Life Sciences, Boston, USA)
 - * SuperSignal west femto maximum sensitivity substrate (Pierce, Rockford, USA)
 - * SuperSignal west pico maximum sensitivity substrate (Pierce, Rockford, USA)

- Film autoradiographique (Biotech, Buckinghamshire, Angleterre)

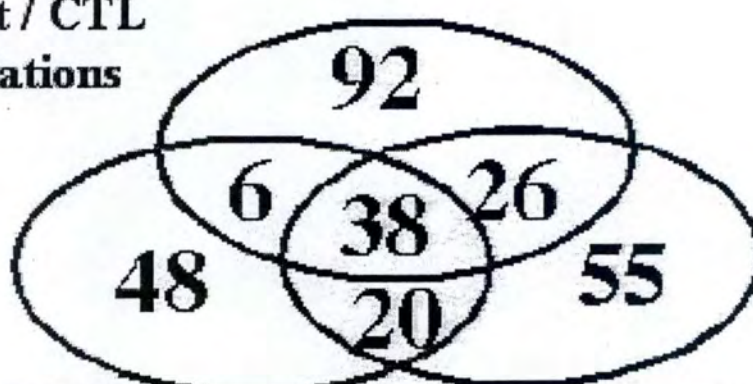
Méthode :

- Décongeler les extraits cellulaires et les faire bouillir 4 min.
- Centrifuger 10 min à 13.000 rpm pour précipiter les composants insolubles.
- Déposer des échantillons sur gel et laisser migrer durant environ 1 heure à 200V dans le tampon de migration.
- Enlever le gel de la cuve et retirer le gel d'empilement.
- Effectuer le montage décrit à la figure III.11 pour le transfert des protéines vers une membrane de PVDF.
- Transférer les protéines du gel vers la membrane en présence de tampon de transfert à 30V durant au moins 2 h.

- Bloquer la membrane en présence de TBS-T + Gloria (5%) durant 1 heure sur un agitateur rotatif (dans un biberon).
- Incuber la membrane avec les anticorps primaires dilués dans du TBS-T + gloria (5%) durant une heure sur agitateur rotatif.
- Rincer 3 fois la membrane durant 5 min avec du TBS-T + Gloria(5%).
- Incuber la membrane avec les anticorps secondaires dilués dans du TBS-T + Gloria(5%) durant une heure sur agitateur rotatif.
- Rincer la membrane une fois 5 min avec du TBS-T + Gloria(5%), deux fois 5 min avec du TBS-T seul et une fois 10 min avec du TBS-T seul.
- Placer la membrane durant 5 min en présence du mélange de révélation sur agitateur rotatif.
- En chambre noire, exposer un film autoradiographique à la membrane pendant des temps variables de manière à obtenir une révélation optimale.
- Placer le film dans la solution de révélation (environ 1 min).
- Rincer à l'eau puis placer dans la solution de fixation.
- Rincer une nouvelle fois à l'eau courante.

**Résultats
et
Discussion**

Senescent / CTL
162 variations



t-BHP / CTL
112 variations

EtOH / CTL
139 variations

Figure IV.1 : Représentation, sous forme d'ensembles, des 413 variations de niveau de transcrits par rapport à la situation « contrôle » correspondant à 285 bandes d'intensités différentes observées par « differential display » réalisé à partir de fibroblastes sénescents et de fibroblastes en SIPS induite par l'EtOH ou le t-BHP.

IV. Résultats

Lors d'un travail antérieur, la technique du "differential display" a été utilisée afin de comparer l'expression génique de fibroblastes en sénescence prématurée après exposition à des stress subcytotoxiques répétés sous éthanol (EtOH) ou sous *tert*-butylhydroperoxyde (t-BHP), de fibroblastes contrôles (non stressés) et de fibroblastes sénescents.

Au total, 413 variations correspondant à 285 bandes différentes ont été relevées dans au moins une de ces quatre populations de fibroblastes (figure IV.1). De nombreux gènes repris dans cette liste ont déjà été identifiés. On peut citer par exemple : S100A13, SM22, APOL, CPR2, ES1, RPN2, etc. Un autre mémoire s'est attaché à la vérification de l'expression différentielle de ces gènes, suggérés par differential display, et ce en utilisant la technique de PCR en temps réel. Notre travail a consisté, dans un premier temps, à identifier les gènes correspondant aux bandes qui n'avaient pas encore été traitées. Parmi ces bandes, nous nous sommes intéressés à celles qui représentent une variation de niveau de transcrits en SIPS et en sénescence répllicative, ainsi que ceux qui présentent une variation de transcrits uniquement dans les deux types de SIPS. Cela représentait un total de 46 candidats.

Tout d'abord, nous allons présenter les résultats obtenus au cours des différentes étapes conduisant à l'identification d'un plus grand nombre possible de gènes correspondant à ces 46 bandes. Ensuite, nous présenterons les résultats, obtenus lors des étapes de vérification par PCR en temps réel et par western-blot, de l'expression différentielle de ces gènes.

IV.1. Séquençage

IV.1.1. PCR de réamplification:

Afin de travailler avec suffisamment de matériel de départ, les 46 fragments candidats sont amplifiés par PCR en utilisant les couples d'amorces qui ont été utilisées lors du "differential display".

Afin d'estimer leur taille et leur pureté, les échantillons PCR sont déposés sur gel d'agarose 2% (figure IV.2). En effet, on sait que l'un des inconvénients du « differential

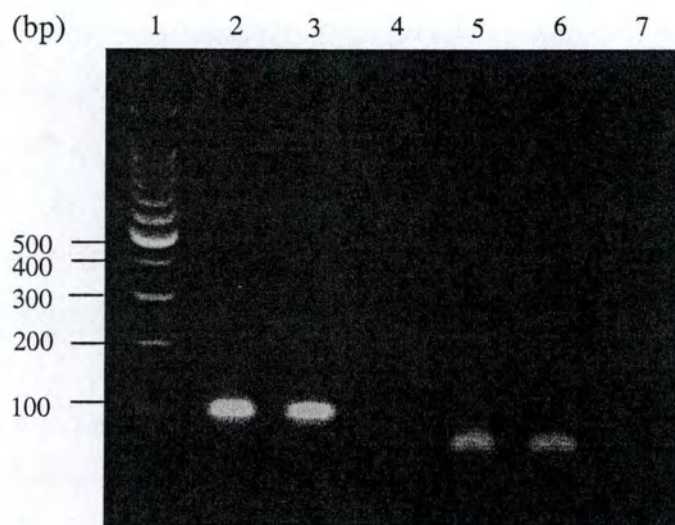


Figure IV.2 : Exemple de visualisation sur gel d'agarose des bandes d'intérêt réamplifiées par PCR. Les produits PCR obtenus sont purs (une seule bande).

- 1 : Etalon de poids moléculaire
- 2 : Produit de la réamplification du candidats 10A01 avec les amorces ddF10 et TVA
- 3 : Produit de la réamplification du candidats 10A01 avec les amorces ddF10 et TVA
- 4 : Blanc-PCR avec les amorces ddF10 et TVA
- 5 : Produit de la réamplification du candidats 15A09 avec les amorces ddF15 et TVA
- 6 : Produit de la réamplification du candidats 15A09 avec les amorces ddF15 et TVA
- 7 : Blanc-PCR avec les amorces ddF15 et TVA



Figure IV.3 : Exemple de visualisation des produits d'amplification obtenus par PCR de criblage afin de déterminer leur taille et donc la présence de l'insert ou non. Pistes 1 et 11 : étalon de poids moléculaire 100 bp (Promega, Madison, USA). Toutes les pistes présentent l'insert à l'exception de la piste 3 (environ 250 bp).

display » est que la population en ADN peut être hétérogène au sein d'une seule bande découpée.

Sur nos différents gels, nous avons parfois observé que certaines bandes ne contenaient pas qu'une seule espèce d'ADNc. Ils ne s'agit probablement pas de contaminants PCR puisqu'on ne retrouve pas de matériel amplifié dans les blancs de PCR. Les bandes multiples pour un seul échantillon sont découpées séparément du gel d'agarose, purifiées à partir de celui-ci et traitées séparément dans la suite des étapes qui mènent au séquençage. On s'assure ainsi de ne pas perdre le candidat qui présente une variation potentielle de niveau d'expression.

IV.1.2. Clonage et séquençage des bandes d'intérêt:

Après purification des échantillons, nous les insérons par ligation dans le plasmide pGEM-T Easy. Le ratio optimal insert : vecteur a été déterminé auparavant pour les ADNc provenant du « differential display », il est de 9 : 1. Le plasmide est ensuite introduit, par la méthode du choc thermique, dans les bactéries *E. Coli Sure* rendues compétentes avec du CaCl_2 . Les bactéries transformées sont alors sélectionnées sur un milieu additionné d'ampicilline, de X-gal et d'IPTG. En effet le vecteur pGEM-T Easy permet un criblage blanc-bleu et nous permet donc de savoir quel clone a incorporé le vecteur contenant l'insert. Les colonies blanches sont alors récupérées et mises en culture dans du milieu liquide contenant de l'ampicilline. Afin de vérifier si nos inserts ont bien été introduits dans le vecteur, on effectue une PCR de criblage à partir des mini-cultures, avec les amorces M13 situées de part et d'autre du site de clonage. Les produits PCR sont alors chargés sur gel d'agarose 2%, ce qui permet, en fonction de la taille, de déterminer les clones dans lesquels les inserts ont été introduits. Si le fragment amplifié lors de la PCR a une taille de 251 bp, l'insert n'est pas présent. Au contraire, si on observe une bande dont la taille correspond à celle de l'insert additionnée de 251 bp, on peut conclure que l'insert est présent (figure IV.3).

Des mini-préparations d'ADN plasmidique sont ensuite réalisées. Les fragments d'intérêt sont séquencés. Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences contenues dans des banques de données, par alignement, réalisé par le programme BLAST disponible sur internet à l'adresse <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>.

Les résultats obtenus sont repris au tableau IV.1. Parmi les résultats obtenus suite à ces alignements, nous nous sommes focalisés sur un nombre restreint de candidats pour la

Tableau IV.1 : Synthèse des résultats de séquençage dont l'alignement avec les banques de données par le programme BLAST a abouti à un résultat.

Candidat	Taille de la séquence alignée (pb)	Score	E value	Résultats du séquençage
d01G02a	76	151	5,00E-35	Homo sapiens 3 BAC RP11-572C15 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence
d01G02b	76	151	5,00E-35	Homo sapiens 3 BAC RP11-572C15 (Roswell Park Cancer Institute Human BAC Library) complete sequence
03A01	158	313	3,00E-83	Homo sapiens ancient ubiquitous protein 1 (AUP1), mRNA
d03G02b	160	311	1,00E-82	Homo sapiens ancient ubiquitous protein 1 (AUP1), mRNA.
11C06	26	38	8,60E-02	Homo sapiens beta tropomyosin (TPM2) gene, exons 1 through 8 and partial cds.
11C09	20	40	1,00E-02	Homo sapiens cystatin C (amyloid angiopathy and cerebral hemorrhage) (CST3), mRNA.
10G01	130	68	1,00E-02	Homo sapiens PAK2 mRNA, complete cds
10G04	26	52	6,00E-06	Homo sapiens haplotype M*2 mitochondrion, complete genome.
11G04	26	52	9,00E-06	Homo sapiens haplotype M*2 mitochondrion, complete genome.
03G01	27	54	2,00E-06	Homo sapiens haplotype M*2 mitochondrion, complete genome.
d03A02	101	200	2,00E-49	Homo sapiens haplotype M*2 mitochondrion, complete genome.
11A06	18	36	3,80E-02	Homo sapiens insulin-like growth factor II receptor (IGF2R) gene, partial cds.
16T02	58	109	2,00E-22	Homo sapiens mRNA for KIAA1501 protein, partial cds
16T03	158	107	3,00E-21	Homo sapiens mRNA for KIAA1501 protein, partial cds.
d01T02b	56	111	5,00E-23	Homo sapiens similar to carnitine palmitoyltransferase 1 alpha, liver isoform (LOC126129), mRNA.
21G02	45	90	1,00E-16	Homo sapiens ubiquitin-conjugating BIR-domain enzyme APOLLON mRNA, complete cds.
d03C01	184	365	9,00E-99	Homo sapiens, ribosomal protein L37a,
15A02b	140	40	2,90E-01	Human DNA sequence from clone 231L4 on chromosome Xq27.1-27.3 contains GSS, STS, complete sequence
3T8	15	30	2,4	Human chromosome 14 cDNA
21A4	23	46	2,00E-04	Homo sapiens, clone MGC
11C8	25	50	2,00E-05	Homo sapiens, clone IMAGE : 4538214, mRNA
14T1a	68	36	1,9	Homo sapiens chromosome 1 clone RP11-86H7, complete sequence
14T1b	51	96	2,00E-18	Homo sapiens similar to high-mobility group
18G3	24	36	2,70E-01	Homo sapiens isolate YN28n mitochondrial control region, hypervariable segment 1

		<i>tBHP</i>	<i>EtOH</i>	<i>Sénescence</i>
18G03	APO J	-	-	=
d03A01	AUP1	+	+	+
21G02	BIRC6	+	+	+
d01T02b	CPT1	-	-	-
11A06	IGFII-R	+	+	=
14T01b	HMG1	-	-	=
16T02	KIAA150	-	-	-

Tableau IV.2 : Numéros des fragments découpés sur le gel de « differential display », nom du transcrit identifié et le sens de la variation observé dans les quatre conditions étudiées (« + » signifie niveau de transcrit plus élevé, « - » signifie niveau de transcrit plus faible, « = » signifie pas de différence de niveau de transcrit mis en évidence.

validation des résultats du « differential display » par RT-PCR en temps réel. Les candidats sélectionnés pour la suite de notre travail l'ont été en fonction d'une part du score obtenu lors de l'alignement et/ou d'autre part de l'intérêt potentiel qu'ils représentaient dans notre problématique, suite aux éléments dont nous disposons à leur sujet.

IV.1.3. Brève description des gènes candidats retenus (tableau IV.2)

IGFII-R (Insulin Like Growth Factor II Receptor) : Il s'agit d'un récepteur glycoprotéique transmembranaire hétérodimérique multifonctionnel qui interagit avec l'IGF II (insulin-like growth factor II) et le M-6P (mannose-6 phosphate) (Hawkes *et al.*, 2002).

IGFII-R est une protéine de 2491 acides aminés (aa). La protéine est constituée d'une séquence signal putative (40 aa) un domaine extra-cytoplasmique d'environ ± 15 séquences répétées (137-167 aa), d'une région transmembranaire (23 aa) et d'un domaine cytoplasmique capable de se lier au collagène (164 aa) (Oshima *et al.*, 1988).

Laureys *et al.* ont montré que le récepteur au mannose-6 phosphate cation-indépendant et le récepteur à l'IGFII sont identiques (Laureys *et al.*, 1988).

Pour ce qui est de l'activité récepteur de l'IGFII-R, on sait que IGFI et IGFII sont des polypeptides mitogènes qui ont des homologies fonctionnelles et structurales avec l'insuline. Les actions physiologiques d'IGFI et d'IGFII sont médiées par leur interactions spécifiques avec les récepteurs de surface cellulaire. Les récepteurs de type I et II lient préférentiellement IGFI et IGFII, respectivement.

IGFII-R ne lie pas l'insuline (Morgan *et al.*, 1987).

En ce qui concerne l'activité de récepteur au M-6P, on sait que les hydrolases acides sont transportées vers les lysosomes via deux voies de transduction du signal qui impliquent ces RMPs (récepteur mannose 6-phosphate). Dans la première voie, les enzymes néosynthétisées sont transportées dans le complexe Golgi après avoir reçu le marqueur de reconnaissance mannose-6 phosphate. Dans la seconde voie, il y a une endocytose, régulée par le récepteur, via laquelle les enzymes lysosomales sont prélevées du milieu extracellulaire par les RMPs de la membrane plasmique et transportées vers les lysosomes. Ces deux voies dépendent de la liaison des enzymes lysosomales aux RMPs et du déplacement du complexe ligand-récepteur vers les compartiments prélysosomaux acides où, sous l'influence du faible pH, le ligand se dissocie du récepteur. Deux RMPs ont été identifiés. Un premier,

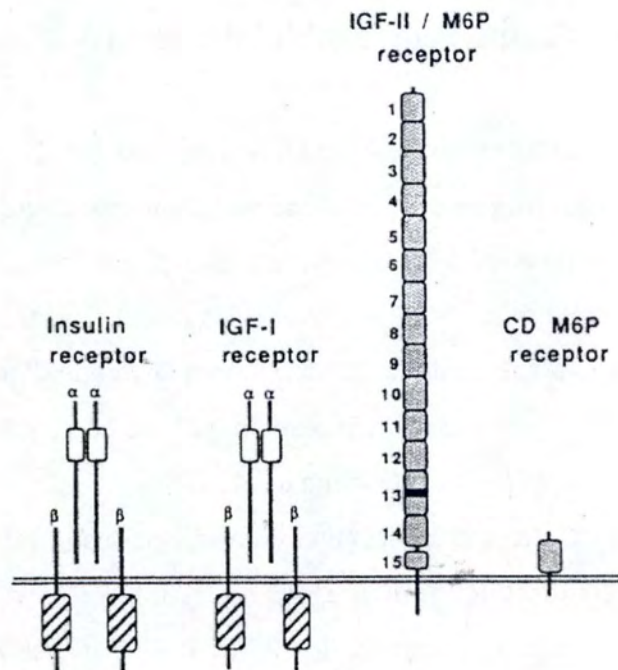


Figure IV.4 : Comparaison schématique de la structure de IGFII-R avec les récepteurs au mannose-6 Phosphate cation dépendant, à l'insuline, et à l'IGFI [Morgan, 1987 #169].

IGFI-R, cation-dépendant, possède un poids moléculaire de 46 kDa et le deuxième, IGFI-R, a un poids moléculaire de 270 kDa (Oshima *et al.*, 1988) (figure IV.4).

BIRC-6 : Ce gène code pour une protéine de 530 kDa de la famille des IAP (inhibiteur de protéines impliquées dans l'apoptose). Ces IAP possèdent des domaines BIR (baculovirus IAP repeat). La protéine BIRC-6 contient un domaine BIR unique ainsi qu'un domaine propre aux enzymes de conjugaison de l'ubiquitine.

BIRC-6 est exprimée dans de nombreux cancers ovariens ainsi que des cancers du cerveau. Parmi les lignées cellulaires du cancer du cerveau, les cellules SNB-78 expriment BIRC-6 à un niveau élevé et montrent une résistance contre plusieurs médicaments anti-tumoraux. Si ces cellules SNB-78 sont traitées avec des oligonucléotides anti-sens contre BIRC-6, le taux d'expression de la protéine BIRC-6 diminue, ce qui sensibilise les cellules à l'apoptose (sous l'effet du *cis*-platine notamment). Chen *et al* en concluent donc que BIRC-6 protège les cellules SNB-78 contre l'apoptose et joue, en partie, un rôle dans la formation des tumeurs et dans la résistance de cette lignée cellulaire face aux médicaments anti-tumoraux (Chen *et al.*, 1999).

AUP1 (*ancient ubiquitin protein 1*) : Jang *et al* ont cloné un nouveau gène de souris, qui code pour une protéine de 410 aa. Le transcrit AUP1 de 1,5 kb est exprimé de manière ubiquitaire dans les tissus de souris. Cette protéine est conservée au cours de l'évolution et une grande similarité est retrouvée entre diverses espèces et l'homme (Jang *et al.*, 1996).

CPTI (*Carnitine Palmitoyl Transférase I*) : La carnitine (acide β -hydroxy- γ -triméthylaminobutyrique) est une molécule de masse moléculaire (162) qui permet le transfert des acides gras dans la mitochondrie, et permet donc leur β -oxydation. Cinq gènes du génome humain sont connus pour coder pour différentes isoformes actives de carnitine acyltransférases :

1. CPTIA : carnitine palmitoyltransférase I, présente notamment dans le foie
2. CPTIB : carnitine palmitoyltransférase I, présente notamment dans les muscles
3. CPTII : carnitine palmitoyltransférase II
4. CROT : carnitine octanoyltransférase
5. CRAT : carnitine acétyltransférase

La carnitine palmitoyl transférase I existe sous deux isoformes : la CPTIA dite du foie et la CPTIB dite du muscle. Les acides gras-CoA (acyl-CoA) présents dans le cytoplasme sont couplés par estérification à la carnitine par une carnitine transférase située sur la face externe de la membrane mitochondriale interne. Les molécules d'acylcarnitine sont ensuite transportées dans la matrice mitochondriale par la carnitine-acylcarnitine translocase. Une autre carnitine transférase, CPTII qui est présente sur la face interne de la membrane mitochondriale interne, va désestérifier l'acylcarnitine, permettant ainsi à la carnitine de sortir de la matrice mitochondriale par le jeu de la carnitine-acylcarnitine et à l'acyl-CoA d'entrer dans la voie de β -oxydation des acides gras (figure IV.5).

HMG1 (high mobility group 1) : Il s'agit d'une protéine chromosomale non-histone. Il existe en fait deux familles de HMG: la famille des HMG1, d'un poids moléculaire d'environ 25 kDa et la famille des HMG14, d'un poids moléculaire d'environ 10 kDa (Wen *et al.*, 1989). La protéine HMG1 comporte 215 acides aminés. Les sites de liaison de HMG1 à l'ADN sont séparés par une séquence de liaison « linker » longue et flexible.

Il existe un nombre élevé de pseudogènes pour HMG1 dans différentes espèces. Trois transcrits (environ 1.0, 1.4 et 2.4 kb) sont exprimés dans tous les organes de mammifères, et ce à différents stades du développement (Wen *et al.*, 1989).

HMG1 possède deux domaines (A et B) similaires appelés « HMG1 boxes », ainsi qu'une longue queue C-terminale. Cette protéine est impliquée dans la transcription, la réparation de l'ADN, la recombinaison, la différenciation, le développement et la transduction des signaux extra-cellulaires. *In vitro*, elle interagit avec l'ADN ainsi qu'avec des protéines importantes telle que p53 (suppresseur de tumeur, homotétramère qui lie l'ADN et induit la transcription de mdm2, p21^{waf-1}, bax, etc.). *In vivo*, l'expression de HMG1 entraîne la sur-expression ou la répression de l'activité transcriptionnelle de différents membres de la famille p53, avec un effet de sur-expression ou de répression spécifique du type cellulaire et du promoteur (Stros *et al.*, 2002).

Wang a montré que HMG1 est exprimé à long terme, plus de 8 heures après stimulation des macrophages de souris en cultures par des endotoxines, ou des cytokines telles que TNF- β (tumor necrosis factor- β) ou l'IL1- α (interleukine 1- α). La quantité de HMG1 augmente également dans le sérum de la souris 8 à 32 heures après exposition à l'endotoxine. L'administration d'anticorps anti-HMG1 atténue la toxicité de l'endotoxine chez la souris et l'administration de HMG1 lui-même est létale (Wang *et al.*, 1999).

HMG1 n'est pas détectable dans le sérum de sujets humains normaux, mais se retrouve à un niveau significatif chez des patients qui présentent une septicémie avancée à un stade causant une dysfonction d'organe. Le taux de HMG1 est plus élevé chez les patients qui succombent suite à une septicémie par rapport aux patients qui survivent.

Dintilhac et Bernués montrent que certaines protéines interagissent avec HMG1. Parmi eux, des activateurs et des répresseurs transcriptionnels comme hnRNP K (heterogenous nuclear ribonucleoprotein K), Me CP2 (repressors like methyl-CpG binding protein 2), pRb (protéine de rétinoblastome), ou Grg1 et Grg5 (Groucho-related gene proteins 1 et 5). Ils suggèrent que HMG1 pourrait jouer un rôle central dans la stabilisation et/ou l'assemblage de plusieurs complexes multifonctionnels à travers des interactions protéines-protéines (Dintilhac *et al.*, 2002).

KIAA1501 : Ce gène est répertorié dans la banque de donnée « HUGE » qui a été développée pour compiler les résultats du séquençage de nombreux ADNc. Tous les candidats séquencés sont nommés systématiquement « KIAA » suivit de 4 chiffres (Kikuno *et al.*, 2002). On ne sait rien de plus actuellement sur ce gène.

IV.2. Vérification de l'expression différentielle des gènes candidats retenus

IV.2.1. Culture cellulaire :

La première étape de cette partie du travail a été de cultiver des fibroblastes WI-38 afin de préparer des échantillons d'ARN dans les mêmes conditions que celles utilisées lors de l'analyse par "differential display". Des cellules jeunes (jour 0), des cellules contrôles, des cellules en SIPS induite par le t-BHP, des cellules en SIPS induite par EtOH et des cellules sénescents.

Nous avons réalisé une série de cinq stress successifs sur des fibroblastes humains WI-38 pré-confluents à raison d'un stress d'une heure par jour pour les cellules stressées au t-BHP (90 μ M) et de deux heures par jour pour les cellules stressées à l'EtOH (5%).

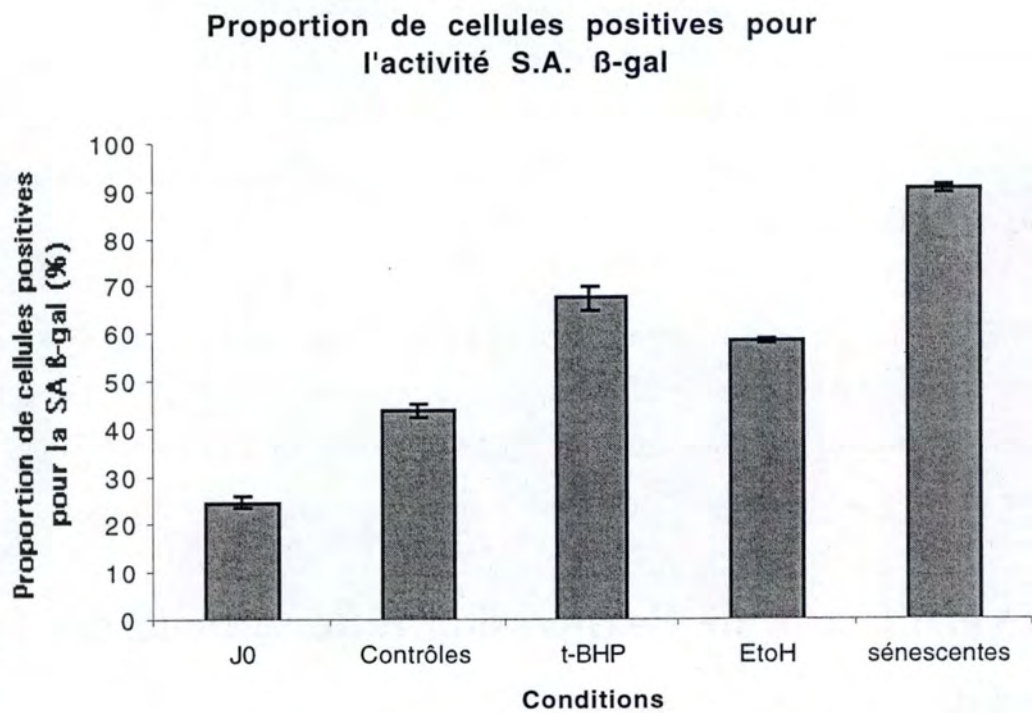


Figure IV.6 : Pourcentage de fibroblastes WI-38 présentant l'activité SA β -gal dans les différentes conditions étudiées (fibroblastes jeunes (J0), fibroblastes contrôles de stress, fibroblastes en SIPS induite par le t-BHP, fibroblastes en SIPS induite par l'EtOH et fibroblastes sénescents).

Nous laissons 2 jours de récupération aux cellules, avant de réaliser un test histochimique pour tester la présence de SA β -gal ainsi qu'un test d'incorporation de thymidine tritiée pour déterminer le potentiel prolifératif, et d'extraire l'ARN et les protéines.

IV.2.1.a. Cellules positives pour l'activité SA β -gal

Résultats (figure IV.6):

Premièrement, nous constatons que la proportion de fibroblastes positifs pour l'activité SA β -gal est très élevée dans les cultures de fibroblastes sénescents. Les fibroblastes en SIPS induite par le t-BHP ou par l'EtOH montrent également une augmentation marquée de cette proportion de fibroblastes positifs pour la SA β -gal.

Deuxièmement, le pourcentage de fibroblastes « contrôles » positifs pour l'activité SA β -gal est plus important que le pourcentage de fibroblastes positifs en jour 0.

Discussion:

Une faible part de l'augmentation de l'activité SA β -gal chez les fibroblastes contrôles de stress par rapport aux fibroblastes avant tout stress peut être attribuée au fait que ces fibroblastes contrôles de stress se sont divisés un peu plus et que les changements successifs de milieu de culture ont probablement aussi un effet stressant. Par contre, on sait que maintenir des fibroblastes à confluence peut entraîner une augmentation de la proportion de fibroblastes positifs pour la SA β -gal (Dumont *et al.*, 2000b).

Enfin, la différence de la proportion de fibroblastes positifs pour l'activité SA β -gal observée entre les fibroblastes en SIPS induite par le t-BHP ou induite par l'EtOH et les fibroblastes sénescents suggère que les cultures de fibroblastes WI-38 en SIPS représentent un état où tous les fibroblastes ne sont pas en SIPS, se rapprochant plus des conditions rencontrées dans une culture pré-sénescence comme montré précédemment (Dumont *et al.*, 2000b).

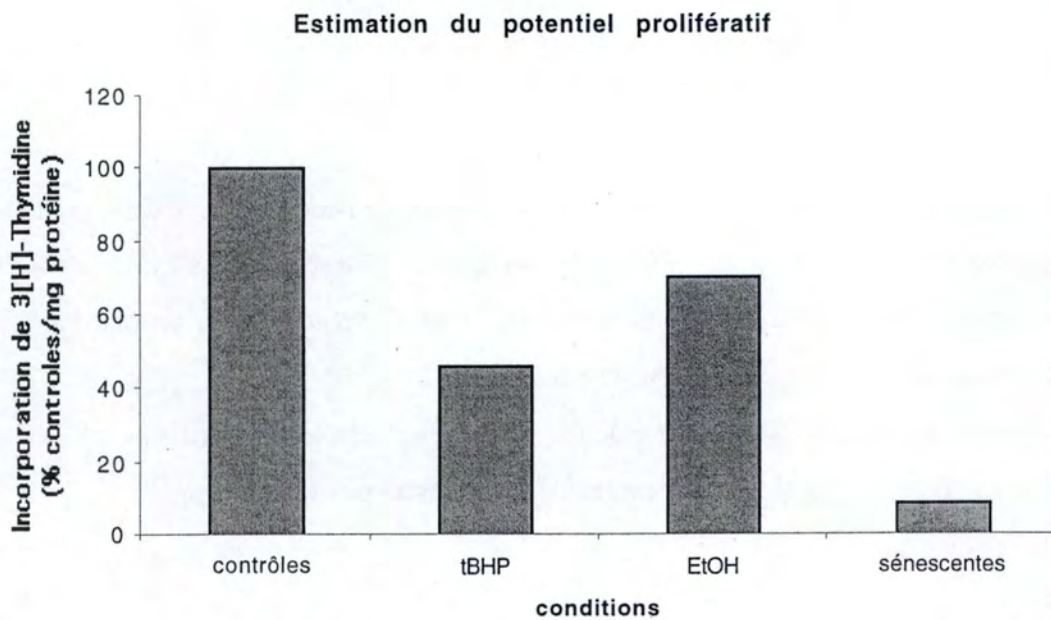


Figure IV.7 : Estimation du potentiel prolifératif des fibroblastes WI-38 par mesure du rapport de l'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN et de la quantité de protéines cellulaires, pour les fibroblastes contrôles, en SIPS induite par t-BHP ou par l'éthanol et pour les fibroblastes sénescents.

IV.2.1.b. Estimation du potentiel prolifératif par mesure de l'incorporation de thymidine tritiée

L'incorporation de thymidine tritiée dans l'ADN rapportée à la quantité de protéines permet d'estimer le potentiel prolifératif des fibroblastes dans les différentes conditions testées. La quantité de protéines dosées reflète le nombre de fibroblastes, comme montré précédemment, en utilisant d'autres tests d'estimation du nombre de fibroblastes (Dumont *et al.*, 2000b) (figure IV.7). La quantité de thymidine tritiée incorporée par les fibroblastes contrôles représente 100%. Ces résultats confirment la diminution très importante du potentiel prolifératif chez les fibroblastes sénescents et les fibroblastes en SIPS induite par le t-BHP ou par l'EtOH. En effet, l'incorporation de thymidine tritiée baisse de 30 à 50% chez les fibroblastes en SIPS et de 90% chez les fibroblastes en sénescence.

Ceci confirme que les cultures de fibroblastes en SIPS ressemblent, tout comme le suggérerait la proportion de fibroblastes positifs pour la SA β -gal, à une culture pré-sénescence où une partie de la population cellulaire a conservé une capacité proliférative. Notons aussi que la proportion de fibroblastes positifs pour l'activité SA β -gal est moins élevée pour les cellules en SIPS induite par l'EtOH que pour celles en SIPS induite par le t-BHP, et que l'incorporation de thymidine tritiée reste plus élevée chez les fibroblastes en SIPS induite par l'EtOH.

IV.2.2. Vérification du niveau d'expression différentiel au niveau de l'ARNm:

A 72 heures après le dernier stress, l'ARN total est extrait suivant le protocole décrit dans les matériels et méthodes. Une transcription inverse permet d'obtenir de l'ADNc qui servira de matrice pour les PCR en temps réel. Lors des premières expériences, des quadruples ont été effectués, ils nous ont permis de voir que les résultats obtenus en PCR en temps réel sont très reproductibles (figure IV.8). Nous nous sommes donc limités à effectuer des doubles, de manière à économiser les réactifs.

Les amorces utilisées lors de la real-time PCR sont choisies pour répondre aux critères décrits dans la partie matériels et méthodes, et les amplicons générés sont uniques (figure IV.10), ce qui prouve la spécificité de ces amorces, sauf pour KIAA1501, lequel présente

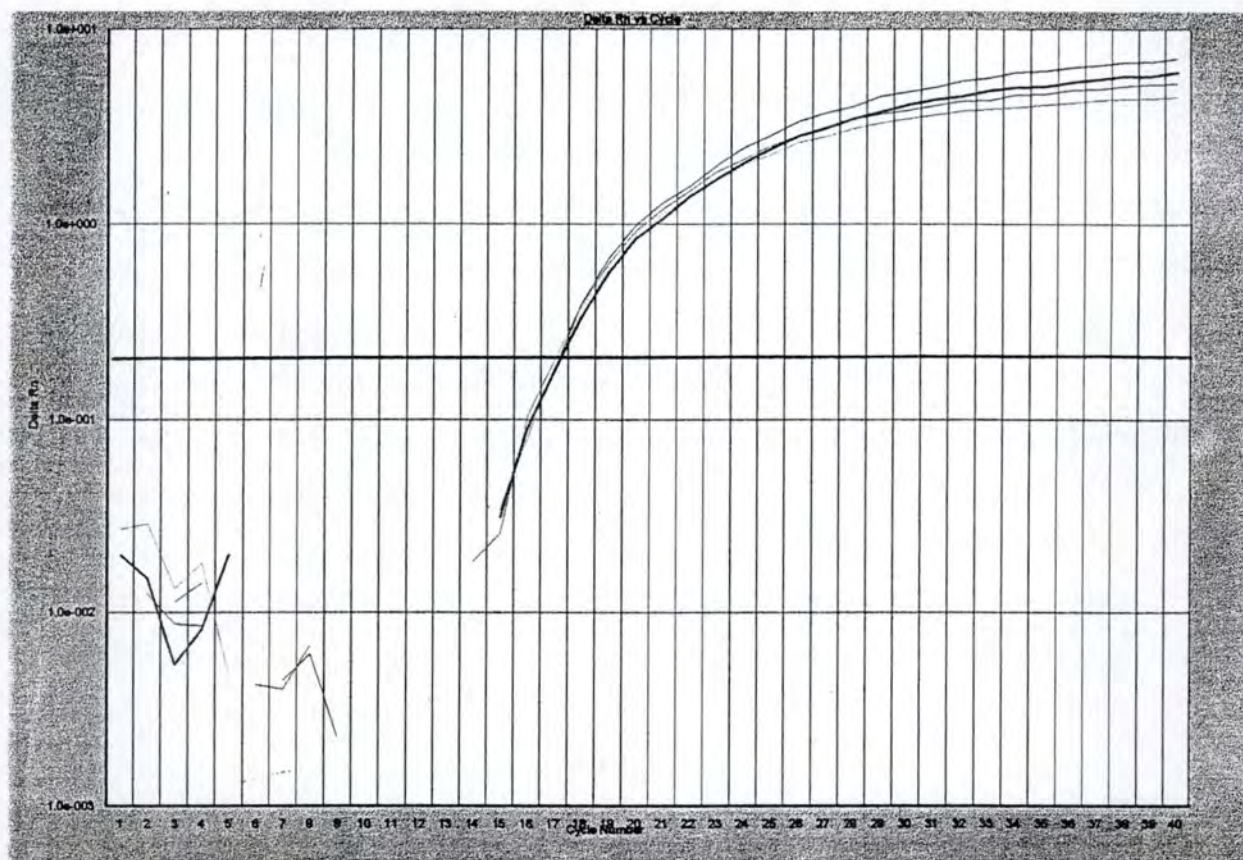


Figure IV.8 : Représentation des courbes d'amplification d'un fragment de l'ADNc de 23 kDa HBP, obtenus par PCR en temps réel dans 4 tubes distincts préparés à partir du même échantillon d'ADNc. Le graphique représente l'intensité du signal de fluorescence émise par le SYBR GREEN en fonction des cycles d'amplification.

A

	Pente	Efficienc
23 kD HBP	-3,84	1,82
AOP2	-3,78	1,84
APOJ	-3,56	1,91
AUP1	-3,58	1,90
BIRC6	-3,89	1,81
CPT1	-3,61	1,89
IGF2R	-3,82	1,83

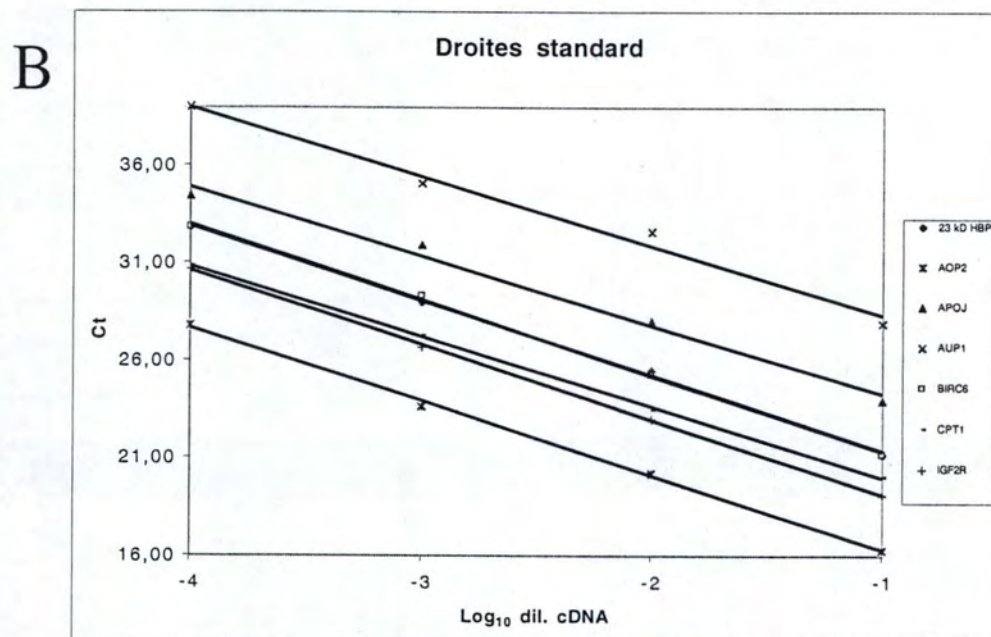


Figure IV.9 : A) Pente des droites standard et efficience d'amplification pour les différents gènes d'intérêt.

B) Graphique reprenant les droites standards pour les gènes dont le niveau de transcrits a été déterminé par PCR en temps réel.

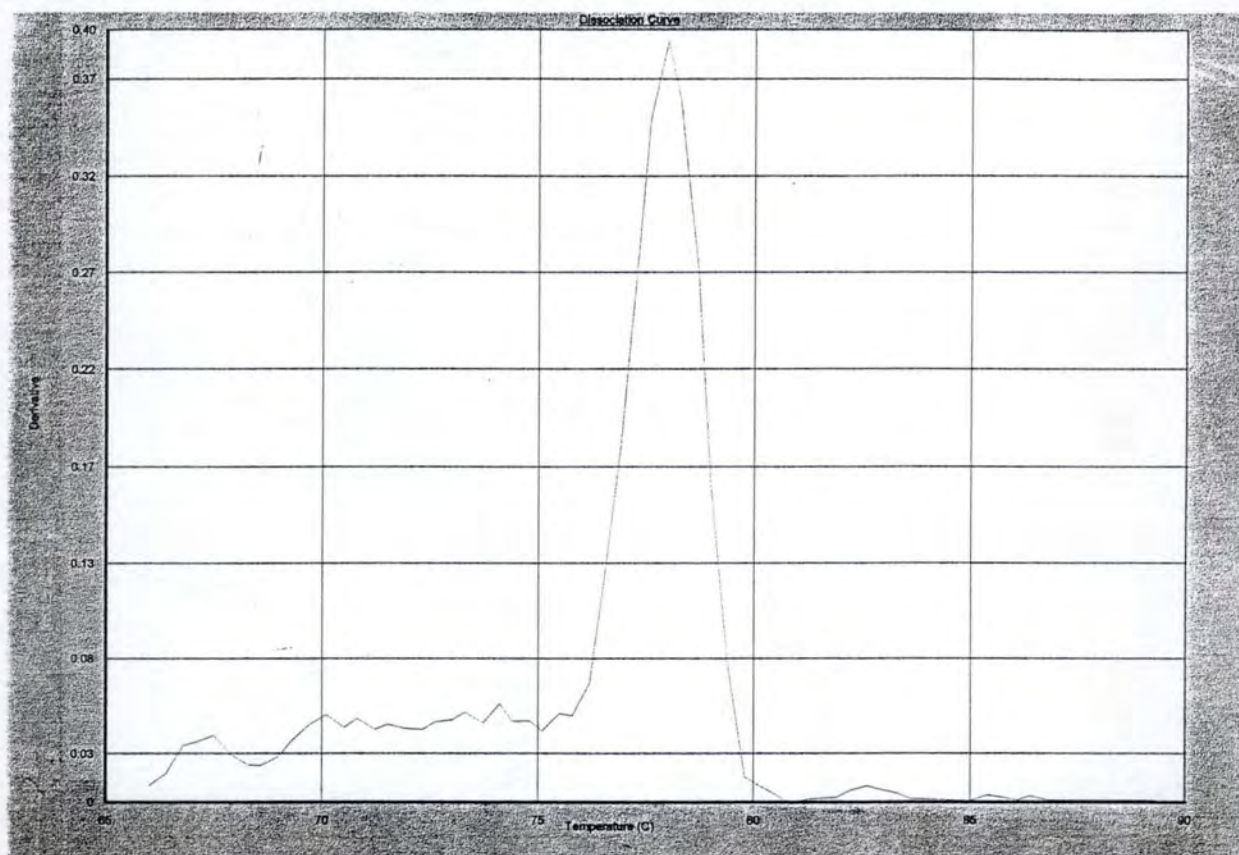


Figure IV.10 : Exemple de courbe de dissociation pour un échantillon, ici IGFII-R. Ce graphique représente la dérivée de l'intensité de fluorescence émise par le SYBR GREEN en fonction de la température.

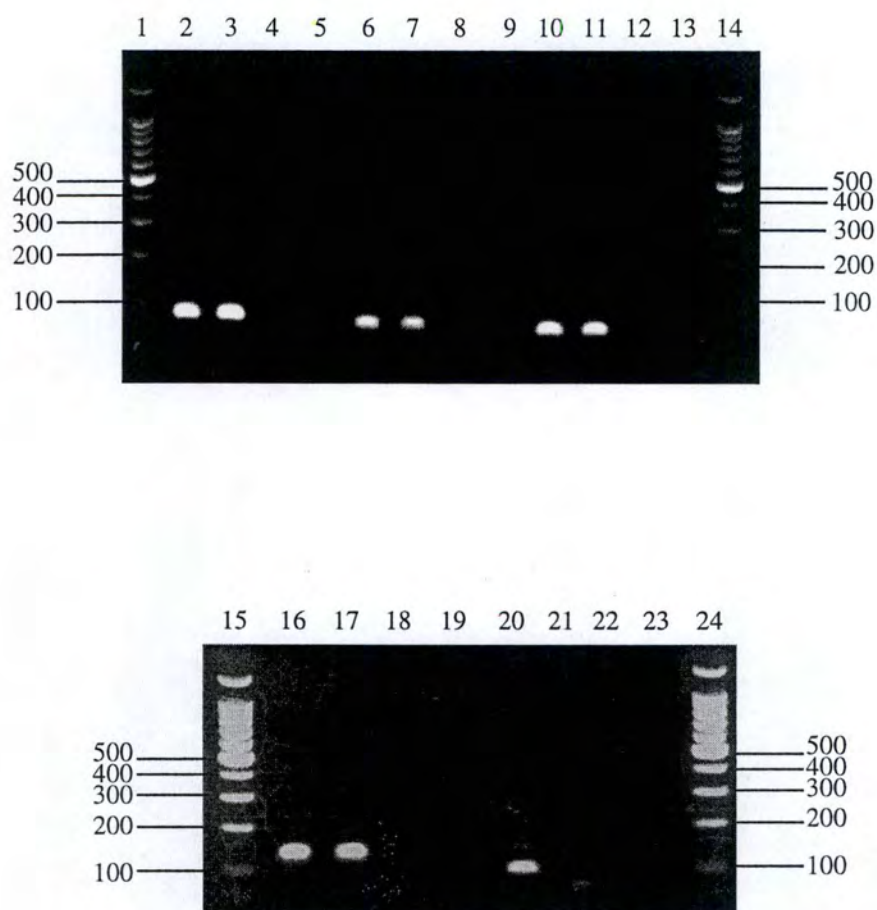


Figure IV.11 : Visualisation des produits d'amplification obtenus par PCR en temps réel afin de vérifier la spécificité des amorces utilisées. Les amplicons générés sont uniques (une seule bande) à l'exception des pistes 20 et 21.

- | | |
|-------------------|-----------------------------|
| 1 : Etalon PM | 15 : Etalon PM |
| 2 : CPTI | 16 : BIRC-6 |
| 3 : CPTI | 17 : BIRC-6 |
| 4 : Blanc CPTI | 18 : Blanc BIRC-6 |
| 5 : Blanc CPTI | 19 : Blanc BIRC-6 |
| 6 : IGFII-R | 20 : KIAA1501 |
| 7 : IGFII-R | 21 : KIAA1501 (peu visible) |
| 8 : Blanc IGFII-R | 22 : Blanc KIAA1501 |
| 9 : Blanc IGFII-R | 23 : Blanc KIAA1501 |
| 10 : AUP1 | 24 : Etalon PM |
| 11 : AUP1 | |
| 12 : Blanc AUP1 | |
| 13 : Blanc AUP1 | |
| 14 : Etalon PM | |

plusieurs bandes après chargement du gel d'agarose, migration et révélation sous UV (figure IV.11).

Les droites standard sont réalisées avec des concentrations en amorces de 900 nM / 900 nM. La figure IV.9 représente les Ct moyens en fonction des dilutions en ADNc pour BIRC-6, CPTI, IGFII-R, AUP1, et 23 kDa HBP. Les pentes des droites permettent de déterminer l'efficacité de PCR. Ici, cette efficacité est proche de 2 et est similaire pour les 4 gènes et le 23 kDa HBP, ce qui est nécessaire pour pouvoir normaliser les résultats obtenus avec le niveau de transcrits de 23 kDa HBP.

IV.2.2.a. Quantification du taux de transcrits dans les différentes conditions cellulaires :

La quantification relative est toujours basée sur le niveau d'un transcrit de référence (ici, le 23 kDa HBP). Cette quantification relative des résultats se fait durant la phase exponentielle de l'amplification par PCR, et n'est donc affectée par aucun paramètre limitant responsable de la phase plateau. La méthode utilisée ici pour normaliser le niveau de transcrits par rapport au niveau du gène de référence est appelée « la méthode $\Delta\Delta Ct$ » avec la différence de niveau d'expression étant égale à $2^{-[\Delta Ct \text{ échantillon test} - \Delta Ct \text{ gène de référence}]}$. Comme l'efficacité de PCR est similaire pour l'ADNc du gène de référence et l'ADNc des 4 gènes étudiés, la quantification dépend seulement des ΔCt . Pratiquement, le ΔCt est obtenu en soustrayant la moyenne des Ct obtenus pour le 23kDa HBP de la moyenne des Ct de chaque gène d'intérêt pour un échantillon d'ADNc. Le $\Delta\Delta Ct$ est calculé en soustrayant les valeurs obtenues pour les fibroblastes jeunes à celles obtenues pour les fibroblastes sénescents. Le $\Delta\Delta Ct$ des fibroblastes en SIPS est calculé en soustrayant les valeurs obtenues pour ceux-ci par rapport aux valeurs obtenues pour les fibroblastes contrôles de stress. La normalisation est différente pour les fibroblastes sénescents et les fibroblastes en SIPS car la confluence des fibroblastes sénescents et stressés est différente. Or on sait que le niveau de confluence peut avoir un effet sur le niveau d'expression d'un gène lié à la sénescence (Dumont *et al.*, 2000a). Les fibroblastes jeunes et sénescents sont en effet moins confluents que les fibroblastes « contrôles » et les fibroblastes en SIPS, ceci étant inhérent à un protocole de stress répétés.

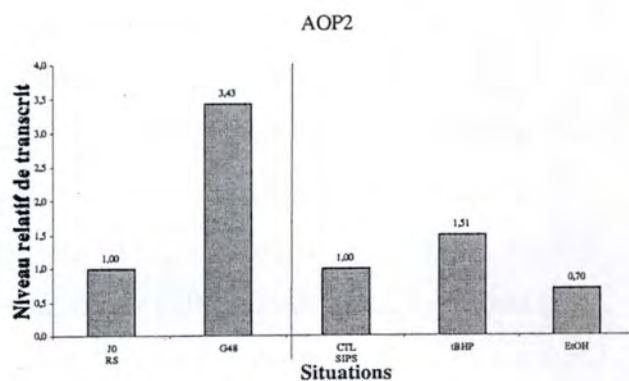
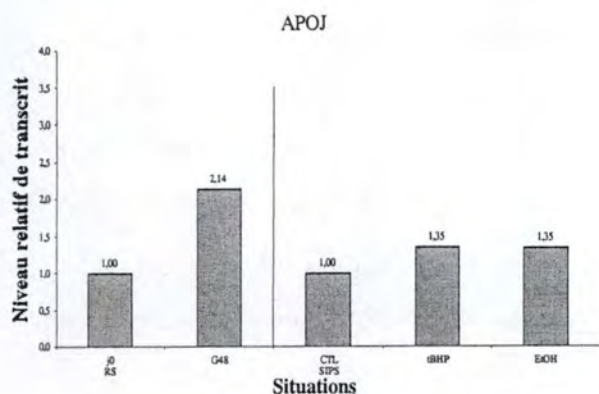
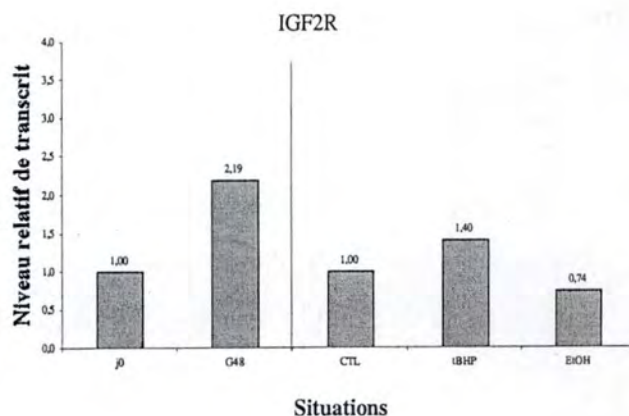
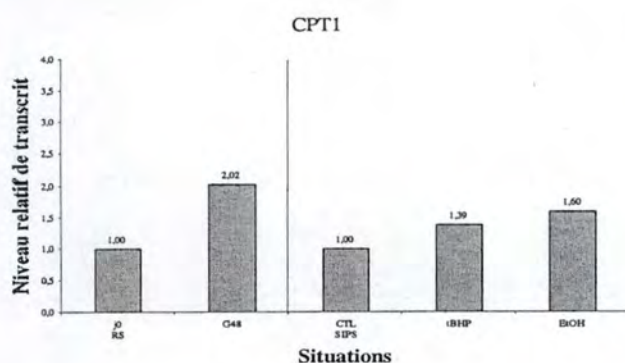
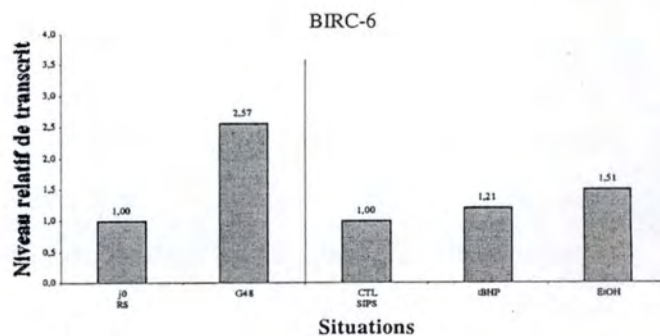
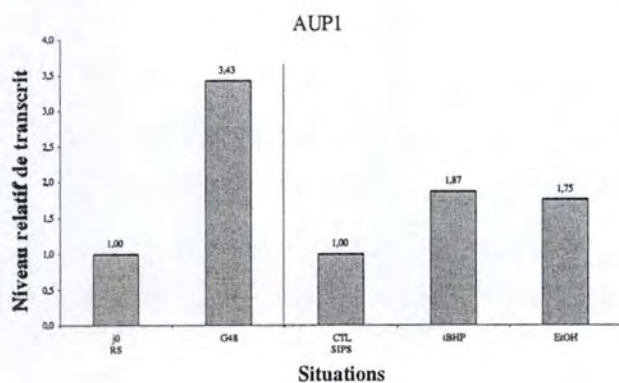


Figure IV.12 : Quantité relative de transcrits dans les différentes conditions cellulaires testées (fibroblastes jeunes (J0), fibroblastes sénescents, fibroblastes contrôles des stress (ctrl), fibroblastes en SIPS induite par le t-BHP ou l'EtOH pour AUP1, BIRC-6, CPT1, IGFII-R, Apo J, AOP2.

La dernière étape consiste à calculer la différence de niveau de transcrits, ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Ceci fixe le niveau d'expression du gène de référence à 1 (2^0) pour les fibroblastes jeunes et pour les fibroblastes « contrôles ».

La figure IV.12 montre les niveaux de transcrits de BIRC-6, IGFII-R, CPT1, AUP1, Apo J et AOP2 dans les différentes conditions étudiées.

L'Apo J est une glycoprotéine dimérique sécrétée. Les deux chaînes α et β qui la composent sont reliées entre elles par plusieurs ponts disulfures. Elle est activée lors de stress thermique où elle joue une fonction du type chaperone. Elle protège de nombreux types cellulaires contre les effets de divers stress (oxydatifs, UV, éthanol) en réduisant l'apoptose (Dumont *et al.*, 2002) ou la SIPS induite par le t-BHP et l'éthanol. Après un choc thermique, des protéines cellulaires se retrouvent sous forme dépliées. L'apolipoprotéine J, agissant comme les « small heat shock proteins », permet le repliement, après son interaction sur les régions hydrophobes, des protéines ayant perdu leur conformation native.

Son taux de transcrits est donc déterminé, dans ces différentes conditions, par PCR en temps réel, afin d'avoir un contrôle positif. En effet, on a montré par northern-blot que le niveau de transcrits de l'apolipoprotéine J est plus élevé chez les fibroblastes WI-38 en sénescence répllicative et en SIPS induite par le t-BHP (Dumont *et al.*, 2000a). Nous retrouvons bien une augmentation du niveau de transcrits de l'apolipoprotéine J dans ces deux conditions. On montre aussi un niveau plus élevé de transcrits chez les fibroblastes en SIPS induite par l'EtOH, ce qui était jusqu'à lors inconnu.

L'AOP2 (antioxydant protéine 2 ou encore 1-cys peroxyredoxine, hORF 6, phospholipase A₂ indépendante du calcium, glutathion peroxydase indépendante du sélénium, peroxyredoxin VI) possède deux activités enzymatiques distinctes : une activité phospholipase A₂, et une activité glutathion peroxydase qui utilise le glutathion comme cofacteur donneur d'électrons (Fisher *et al.*, 1999). Elle joue un rôle dans la détoxification des hydroperoxydes phospholipidiques via ses activités enzymatiques. Ainsi les acides gras peroxydés libérés grâce à la première activité sont réduits en alcool grâce à la seconde (van Kuijk *et al.*, 1987). Les propriétés bifonctionnelles de cette protéine sont compatibles avec un rôle simultané de la régulation du turn-over des phospholipides et dans la protection contre les dégâts oxydatifs (Chen *et al.*, 2000a). Une étude protéomique (Dierick *et al.*, soumis pour publication) montre qu'une isoforme de cette protéine est en quantité moindre (48%) chez les fibroblastes sénescents et en quantité plus importante chez les fibroblastes en SIPS induite par

A			<i>tBHP</i>	<i>EtOH</i>	<i>Sénescence</i>
	18G03	APO J	-	-	=
	d03A01	AUP1	+	+	+
	21G02	BIRC6	+	+	+
	d01T02b	CPT1	-	-	-
	11A06	IGFII-R	+	+	=

14T01b	HMG1	-	-	=
16T02	KIAA150	-	-	-

B			<i>tBHP</i>	<i>EtOH</i>	<i>Sénescence</i>
	18G03	APO J	+	+	+
	d03A01	AUP1	+	+	+
	21G02	BIRC6	+	+	+
	d01T02b	CPT1	+	+	+
	11A06	IGFII-R	+	-	+

AOP2	+	-	+
-------------	---	---	---

Tableau IV.3 : Comparaison des résultats obtenus par « differential display » (A) et par PCR en temps réel (B).

le t-BHP (144%) quand on compare à des fibroblastes jeunes non stressés. Nous avons donc voulu savoir si la quantité relative de ses transcrits évolue dans la même direction dans ces différentes conditions. On observe bien une augmentation significative du taux de transcrits de l'AOP2 pour les fibroblastes sénescents et une augmentation pour les fibroblastes en SIPS induite par le t-BHP. Cependant, ce taux de transcrits diminue légèrement (30%) chez les fibroblastes en SIPS induite par l'EtOH

Ces résultats confirment qu'il existe des faux positifs dans les résultats issus du « differential display », puisque les résultats de ce dernier semblaient suggérer le niveau relatif de transcrits de l'apo J était plus faible chez les fibroblastes sénescents et en SIPS (tableau IV.3). Par contre, la PCR en temps réel confirme les résultats obtenus avec le « differential display » pour BIRC-6, AUP1, et IGFII-R. En revanche, la CPTI dont le niveau de transcrits semblait plus faible chez les fibroblastes sénescents et chez les fibroblastes en SIPS par rapport aux fibroblastes jeunes lors de l'analyse par « differential display » montre en fait une augmentation de ce niveau lorsque l'on utilise la PCR en temps réel.

Pour tous les transcrits testés, on observe une augmentation de plus de deux fois dans au moins une des conditions expérimentales testées. Chez les fibroblastes sénescents, on observe une augmentation des quantités de transcrits pour tous les candidats testés.

Tous ces transcrits montrent aussi, dans une moindre mesure, une augmentation de leur niveau relatif dans les fibroblastes exposés aux stress répétés sous t-BHP. Etant donné qu'une population cellulaire est toujours hétérogène, toutes les cellules n'entrent pas en SIPS après des stress subcytotoxiques. En effet, certains fibroblastes sont capables de récupérer des effets des stress et n'entrent pas en SIPS (Dumont *et al.*, 2001). D'où un effet probable de « dilution » de l'augmentation de niveau relatif de ces transcrits dans les fibroblastes réellement en SIPS. Il faudrait pouvoir travailler avec une population de fibroblastes où toutes les cellules sont en SIPS. Cela serait possible en augmentant les doses de stress jusqu'à ce qu'aucune cellule ne récupère des stress, mais se ferait inévitablement au prix d'une cytotoxicité très élevée (Toussaint *et al.*, 1992).

Pour les fibroblastes exposés aux stress répétés sous EtOH, des résultats similaires sont observés, sauf pour l'AOP2, où le niveau relatif de transcrits chute à 70% de celui observé par les fibroblastes contrôles.

Une autre solution consisterait à isoler spécifiquement les fibroblastes en SIPS. Pour ce faire, on pourrait par exemple déterminer le niveau protéique de IGFII-R dans les fibroblastes sénescents, ou ayant été exposés à des stress subcytotoxiques, et en cas de

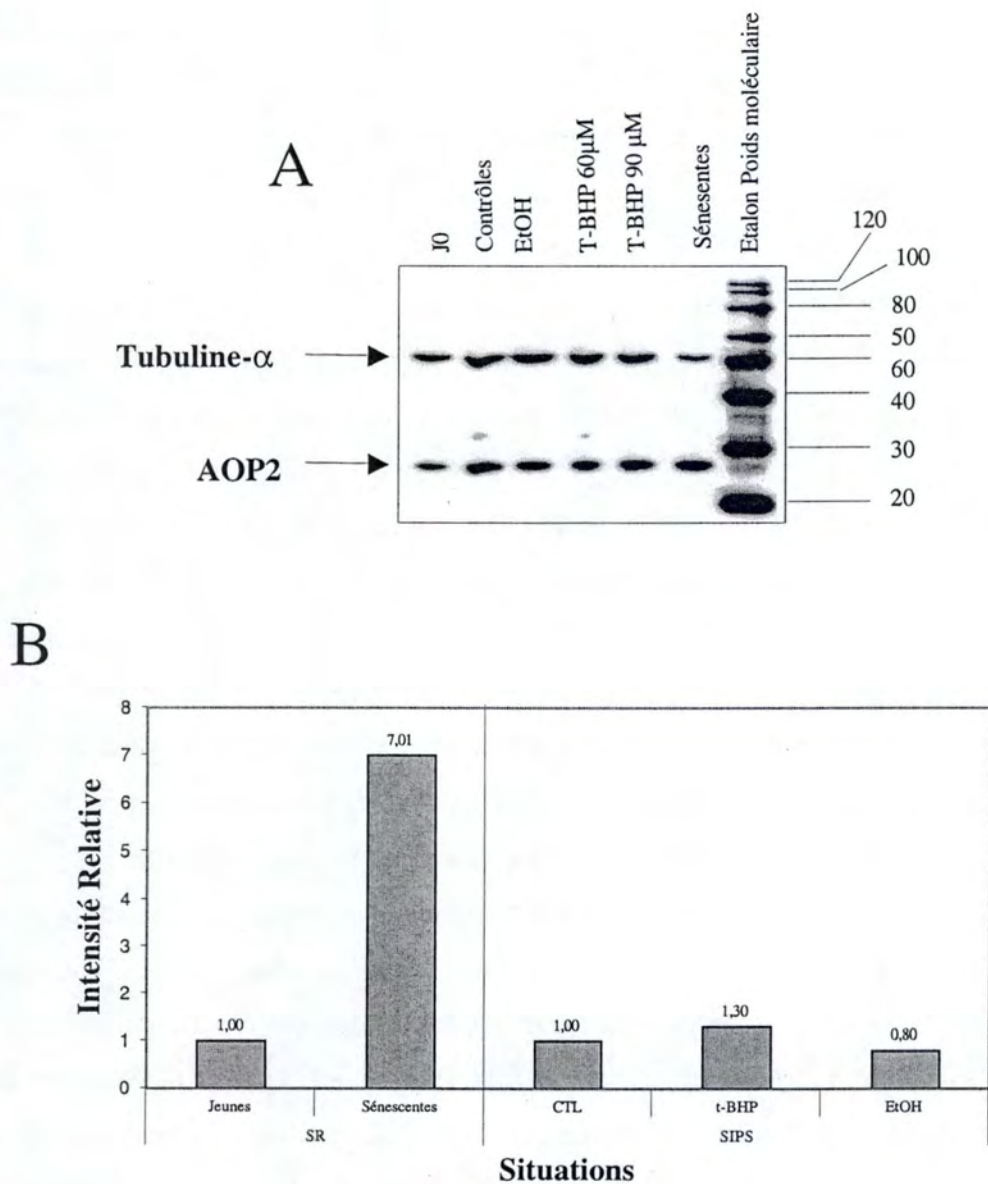


Figure IV.13 : A) Western-blot réalisé en présence des anticorps dirigés contre l'AOP2 et la tubuline- α (protéine de référence), à partir des extraits cellulaires issus de fibroblastes contrôles de stress, fibroblastes jeunes, fibroblastes en SIPS induite par t-BHP (60 et 90 μ M), fibroblastes en SIPS induite par EtOH, fibroblastes en sénescence répliative.

B) Quantification des bandes obtenues par western-blot, montrant le niveau de protéine AOP2 présente dans les différentes conditions de culture.

différence, avérée par rapport aux fibroblastes jeunes ou contrôles de stress, se servir de cette différence pour trier les fibroblastes au moyen d'un FACS (Fluorescent Analysis Cell sorting) en utilisant un anticorps spécifique couplé par exemple à un fluorochrome.

IV.2.3. Détermination du niveau d'expression protéique :

Une quantité relative plus élevée de transcrits se traduit-elle forcément par une quantité plus élevée de la protéine correspondante ? Pour répondre à cette question, une des approches possibles est de réaliser de western-blots. Dans ce cas, il est impératif de posséder un anticorps capable de reconnaître la protéine d'intérêt. Nous n'avons pas trouvé d'anticorps reconnaissant les protéines CPT1, BIRC-6, IGFII-R et AUP1. Un anticorps anti-AOP2 nous a été fourni par le professeur Fisher (Université de Pennsylvanie, USA). Il existe d'autre part un anticorps anti-apolipoprotéine J commercial.

Nous avons donc comparé le niveau protéique de l'AOP2 et de l'apolipoprotéine J à celui d'une protéine de référence, la tubuline, dans les différentes conditions étudiées.

Le western-blot réalisé pour l'AOP2 dans les différentes conditions étudiées montre que la protéine est fortement surexprimée chez les fibroblastes sénescents par rapport aux fibroblastes jeunes (figure IV.13). La surexpression est moins marquée chez les fibroblastes en SIPS induite par le t-BHP par rapport aux fibroblastes contrôles de stress. Les fibroblastes en SIPS induite par l'EtOH présentent une légère sous-expression de l'AOP2 par rapport aux fibroblastes « contrôles ». Tout comme au niveau de la variation du taux de transcrits, l'interprétation de ces différences d'expression au niveau protéique peut se faire de deux façons différentes : lors d'une détection de surexpression, soit la quantité de protéines traduites est augmentée, soit ce taux de protéines traduites reste au même niveau, mais la protéine est dégradée.

Face à tout cela, il est important de remarquer que les résultats obtenus par PCR en temps réel et par western-blot concordent entre eux, en ce qui concerne l'AOP2. En effet, tant au niveau du taux de transcrits qu'au niveau du taux de traduits, une surexpression significative est notée pour les cellules en sénescence répliquative par rapport aux fibroblastes jeunes. Et la même légère surexpression est observée pour les fibroblastes en SIPS induite par t-BHP dans les deux études, par rapport aux fibroblastes contrôles de stress. La troisième similarité est la légère sous-expression pour les fibroblastes en SIPS induite sous EtOH par rapport aux fibroblastes contrôles de stress. La conclusion que l'on peut alors tirer en ce qui

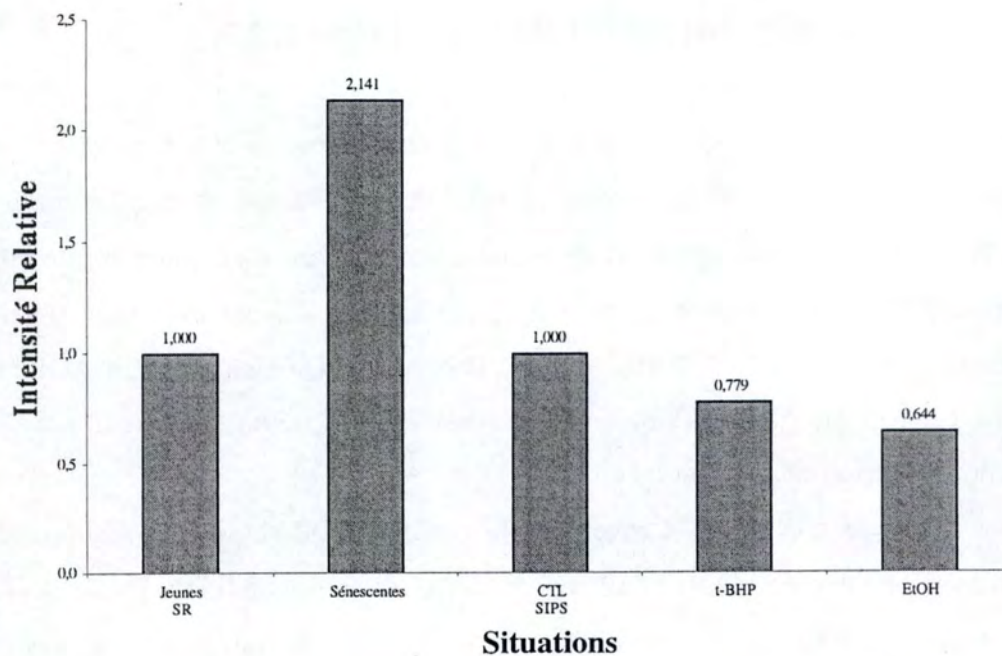


Figure IV.14 : Quantification des bandes obtenues par western-blot, montrant le niveau de protéine Apo J présente dans les fibroblastes contrôles de stress, fibroblastes jeunes, fibroblastes en SIPS induite par t-BHP, fibroblastes en SIPS induite par EtOH, fibroblastes en sénescence réplivative.

concerne l'AOP2, est qu'elle est surexprimée dans nos fibroblastes en sénescence répllicative et les fibroblastes en SIPS induite par le t-BHP. Elle constitue donc la preuve que les stress ont été effectués correctement et que nos fibroblastes sont bien en SIPS ou en sénescence répllicative, puisqu'ils présentent ce biomarqueur de la sénescence.

Les résultats préliminaires obtenus montrent une augmentation de niveau de protéines chez les cellules sénescents et peut-être une diminution chez les cellules en SIPS induite par EtOH ou t-BHP. Toute fois, ce western-blot n'a été fait qu'une fois et cette expérience doit être répétées pour confirmer les résultats.

**Conclusions
et
Perspectives**

V. Conclusions et perspectives

Les fibroblastes diploïdes humains en culture acquièrent, au cours des divisions cellulaires, des biomarqueurs associés à la sénescence répllicative. Parmi les biomarqueurs de la sénescence répllicative, on peut citer l'arrêt du cycle cellulaire, la morphologie cellulaire, le raccourcissement des télomères, l'activité SA β -gal associée à la sénescence, l'altération du génome mitochondrial, la modification du niveau d'expression de certains gènes particuliers, etc. Beaucoup d'études ont montré que ces fibroblastes exposés à des stress subcytotoxiques sous H_2O_2 , UVB, éthanol ou t-BHP entrent en SIPS (sénescence induite prématurément par les stress). Cette dernière est caractérisée par des biomarqueurs communs à ceux associés à la sénescence répllicative. Parmi les types de stress pour lesquels on connaît le moins les effets de répétition du stress à une dose subcytotoxiques, se trouve le stress sous éthanol.

Tout ce qu'on savait jusqu'à ce travail était que la morphologie cellulaire des cellules exposées à ces stress ressemble à la morphologie sénescence (Toussaint *et al.*, 1995). (Dumont *et al.*, 2002) et que la proportion des cellules positives pour la SA β -gal augmente fortement (Dumont *et al.*, 2000b). Nous avons confirmé dans ce travail, que les cellules exposées à l'éthanol de manière répétée connaissent bien une augmentation dans leur proportion de cellules positives pour la SA β -gal. Nous avons montré que ces cellules connaissent aussi une baisse importante de leur potentiel prolifératif, ce qui n'avait jamais été fait auparavant.

La comparaison des résultats obtenus pour les mesures d'activité SA β -gal et de potentiel prolifératif, nous montre que le classement des conditions étudiées par ordre croissant d'activité SA β -gal correspond à celui de l'ordre décroissant de potentiel prolifératif. (cellules exposées à l'éthanol, au t-BHP et cellules sénescences. Nous confirmons donc la relation inverse entre ces deux biomarqueurs, ce qui confirme que l'activité SA β -gal est un marqueur d'arrêt des divisions cellulaires. (Dumont *et al.*, 2000b).

Pourrait-on imaginer des conditions de stress où la réponse aux stress par population cellulaire serait tout à fait homogène? Pour illustrer ceci, s'il n'y avait aucune hétérogénéité, un concept tel que la courbe de cytotoxicité en fonction de la dose d'un produit toxique, n'existerait pas et toutes les cellules mourraient à partir d'une concentration donnée en produit toxique. Au niveau de l'animal, notons aussi qu'on utilise des concepts tels que la dose létale qui tue 50% des animaux, reflétant aussi l'hétérogénéité existant d'animal à animal.

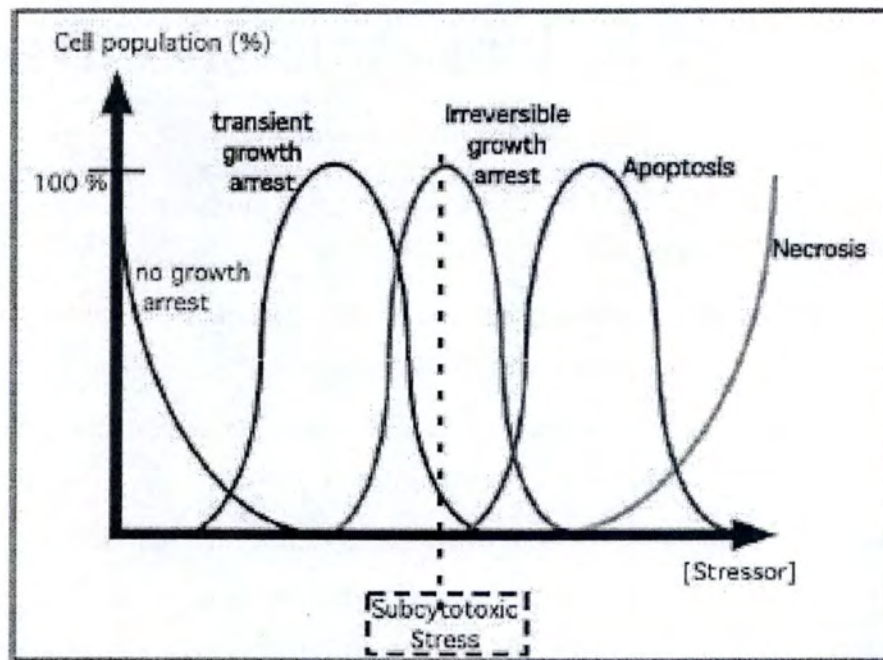


Figure V.1 : Quand une population d'un type cellulaire donné est exposée à des stress subcytotoxiques, une grande majorité de cellules arrête leur croissance de façon irréversible et deviennent prématurément sénescents, avec une minorité de cellules pouvant éventuellement retourner en mitose [Toussaint, 2002 #181].

Suite à cette hétérogénéité, tous les fibroblastes n'entrent pas en SIPS lorsqu'ils sont exposés à une dose donnée de molécule stressante. De manière générale, on sait que les cellules adoptent un comportement différent en fonction de la dose en molécules stressantes à laquelle elles sont confrontées. Les différents comportements possibles s'étalent entre un retour aux conditions intracellulaires initiales d'avant stress et la mort par nécrose, avec des comportements intermédiaires tels que le SIPS ou le déclenchement de l'apoptose. En pratique, on se rend compte que, suite à l'hétérogénéité des cultures de cellules, toutes les cellules n'adoptent pas le même comportement après un stress à une dose donnée (figure V.1) (Toussaint *et al.*, 2002a). Expérimentalement, nous avons le choix entre utiliser des doses subcytotoxiques, et dans ce cas, permettre à certaines cellules de récupérer du stress tandis que la majorité d'entre elles entrent en SIPS, ou réaliser des stress à doses cytotoxiques où la proportion de cellules entrant en SIPS est d'autant plus écrasante que le stress a été intense. Nous suggérons que l'utilisation de doses subcytotoxiques, répétées dans le temps, se rapproche plus de conditions susceptibles d'être rencontrées *in vivo*.

Etant donné cette hétérogénéité de la réponse des cellules à des doses répétées de molécules stressantes, il serait heureux de pouvoir séparer les cellules qui entrent en SIPS de celles qui récupèrent du stress. C'est aussi dans cette optique qu'ont été entreprises des démarches visant à séparer ces cellules sur base, par exemple, de différences éventuelles du niveau d'expression de certains récepteurs membranaires. Ces démarches ont consisté en une approche protéomique et transcriptomique. Ces démarches visaient aussi à comparer l'expression génique des cellules en SIPS et des cellules sénescents à celle des cellules dites jeunes, donc à faible nombre de passages en culture, pour savoir dans quelle mesure les cellules en SIPS et les cellules sénescents possèdent des modifications plus ou moins similaires du niveau d'expression génique. L'analyse transcriptomique a été réalisée par "differential display". Cette technique permet de visualiser sur gel des niveaux différents d'amplicons issus de PCR réalisées en utilisant des amorces aléatoires à partir d'ADNc produit par transcription inverse de l'ARNm présent dans les cellules à un moment donné et dans des conditions données. Dans notre cas, il s'agissait de fibroblastes WI-38 à 72 heures après exposition à des stress subcytotoxiques sous éthanol ou sous t-BHP, et de fibroblastes WI-38 sénescents. Un désavantage de cette technique est qu'elle génère des faux-positifs, nécessitant la vérification par une autre technique, optimisée pour chaque transcrit étudié, et donc fiable.

Dans ce travail, nous avons utilisé la PCR en temps réel. Nous avons été très positivement étonnés de l'extrême reproductibilité des résultats obtenus en utilisant cette

technique. Ceci a été confirmé par les résultats obtenus dans deux autres travaux réalisés en parallèle. Un de ceux-ci visait notamment à étudier le niveau de transcrits de l'apolipoprotéine J chez les fibroblastes de peau exposés à des stress subcytotoxiques sous UVB. L'autre, était consacré à la vérification des niveaux de transcrits différentiels de candidats issus du "differential display" et déjà préalablement identifiés. Le "differential display" réalisé dans ces conditions ayant donné plus de 400 variations correspondant à 285 bandes, le travail de clonage, de séquençage et d'identification des fragments d'intérêts contenus dans ces bandes est très conséquent. Nous nous sommes focalisés sur l'identification de fragments d'intérêt issus du "differential display" et qui n'avaient jamais été, ni clonés, ni séquencés, ni identifiés. Plus précisément, nous avons concentré nos efforts sur les bandes présentant une différence d'intensité chez les cellules sénescences et/ou dans les deux types de SIPS. Après un long travail, nous avons pu identifier 24 fragments sur 55 clonés et séquencés (tableau V.1). En fonction des scores et des valeurs attendues issus de l'alignement réalisé par BLAST, et/ou du rôle potentiel de ces gènes en SIPS, nous avons sélectionné 7 gènes, dont nous avons voulu vérifier le niveau de transcrits par PCR en temps réel. Pour les 5 transcrits dont nous avons pu mesurer le niveau relatif dans la SIPS induite par le t-BHP ou l'EtOH ou dans la sénescence répliquative par rapport aux cellules jeunes, seuls deux candidats sur six (AUP1 et BIRC-6) présentent des variations de niveau de transcrits allant dans le même sens après "differential display" et PCR en temps réel. Ceci confirme l'extrême importance de vérifier les résultats obtenus par "differential display" par une autre méthode alternative.

En ce qui concerne le parallélisme entre une modification de niveau de transcrits et le niveau protéique, nous avons pu comparer le niveau d'AOP2 et d'Apo J, puisque nous disposions des anticorps spécifiques. Plusieurs essais de western-blot, dans plusieurs conditions, ont été réalisés avec un anticorps anti-IGFII-R, sans jamais pouvoir détecter cette protéine. Nous nous posons donc des questions sur cet anticorps fourni par le professeur Von Figura. Les western-blot réalisés pour détecter l'AOP2 montrent que leur niveau protéique augmente en sénescence répliquative et en SIPS induite par le t-BHP et l'éthanol. Les résultats obtenus pour l'Apo J sont plus intrigants et devront être confirmés.

On sait que l'Apo J confère une résistance contre les stress pro-apoptotiques, or on sait que les cellules sénescences et en SIPS résistent mieux à ces stimuli que les cellules jeunes (Dumont *et al.*, 2002). BIRC-6 est un inhibiteur d'apoptose et son niveau de transcrits augmente aussi dans les trois situations étudiées (Chen *et al.*, 1999). On sait que IGFII-R peut, selon le type cellulaire, bloquer ou favoriser l'apoptose, avec un rôle potentiel de résistance à des stress pro-apoptotiques, chez les cellules normales. AOP2, par ses fonctions

antioxydantes, limite les dégâts de type peroxydation lipidique, et donc protège aussi les cellules contre des stress oxydatifs pro-apoptotiques (Chen *et al.*, 2000a).

Dans le cas des stress sous H_2O_2 , on sait que la SIPS est l'ultime barrière permettant la survie des cellules, qui entrent en apoptose lorsqu'on augmente légèrement la concentration en H_2O_2 au delà de la concentration favorisant la SIPS (Chen *et al.*, 2001). Vu le nombre de barrières anti-apoptotiques mises en place chez les cellules en SIPS, on peut émettre l'hypothèse que, si l'on supprime ces barrières, en utilisant par exemple des oligonucléotides anti-sens, la proportion de cellules en SIPS va chuter au profit d'une augmentation des cellules entrant en apoptose.

Les cellules sénescents et en SIPS se caractérisent aussi par un blocage du cycle cellulaire en phase G1 (Chen *et al.*, 1998). On sait que la protéine CDKI p21^{waf-1} est surexprimée en SIPS sous H_2O_2 et t-BHP (on ne le sait pas pour la SIPS induite par l'éthanol) et chez les cellules sénescents. On sait aussi que l'ostéonectine, qui lie le PDGF et donc peut déterminer la capacité proliférative des cellules, est surexprimée chez les cellules sénescents et le cellules en SIPS induite par H_2O_2 et t-BHP (pas de donnée disponible en ce qui concerne la SIPS induite par l'éthanol).

Enfin, une augmentation de la quantité de pyruvate kinase chez les fibroblaste sénescents et en SIPS induite par t-BHP et EtOH a été trouvée. (mémoire de S. Chiarizia). Cette enzyme régule la glycolyse. Si cette augmentation de la quantité de protéines s'accompagne d'une activité enzymatique augmentée par cellule, ceci favorise la synthèse de pyruvate, source de lactate. On sait par ailleurs que la quantité de lactate produite par cellule est augmentée chez les cellules sénescents (Goldstein *et al.*, 1982).

Le pyruvate est aussi à l'origine de l'acétyl-CoA, intervenant dans le cycle de Krebs et la synthèse des acides gras (Rawn, 1990). Or nous avons trouvé une augmentation du niveau de transcrits de la CPTI qui, si elle s'accompagne d'un niveau protéique de CPTI plus élevé, pourrait favoriser la β -oxydation des acides gras.

La surexpression des protéines d'intérêts dans ce travail permettra de savoir si elles ont une influence sur la réponse aux stress subcytotoxiques. Par exemple, la surexpression des protéines anti-apoptotiques peut être envisagée. A l'inverse, on pourra aussi utiliser des oligonucléotides anti-sens pour déterminer le niveau d'expression de ces protéines.

Pour les cas où la modification de niveau de transcrits ne s'accompagne pas de modification de niveau protéique, l'étude de la régulation post-transcriptionnelle de ces gènes pourra être envisagée.

Ces quelques gènes, sur lesquels nous avons travaillé ici, seront représentés sur le damier à ADN "Senechips" construit actuellement au laboratoire et sur lequel seront présents plus de 250 gènes intervenant dans le cycle cellulaire, l'apoptose (pro- et anti-apoptotiques), la réponse aux stress, etc. Il sera possible, dans un futur proche, d'établir comment les modifications des niveaux de transcrits des quelques gènes qui nous ont intéressés dans ce travail, s'inscrivent dans le comportement général des modifications de niveaux de transcrits de ces 250 gènes. On pourra par exemple savoir si la résistance potentielle des cellules en SIPS à l'apoptose se confirme pour d'autres transcrits dont le produit protéique possède une fonction, pro- ou anti-apoptotique. Lorsque des cellules immortalisées Hela surexpriment le facteur de transcription c-Rel, on voit qu'elle arrêtent de se diviser, qu'elles deviennent positives pour la SA β -gal mais qu'elles entrent assez rapidement en apoptose dans les 48 heures suivant l'apparition de l'activité SA β -gal (Bernard *et al.*, 2001). Or, nous savons que les fibroblastes en SIPS n'entrent pas en apoptose après établissement de la SIPS. En effet, on a déjà suivi individuellement des cellules en SIPS vivantes pendant au moins 28 jours après stress subcytotoxiques sous t-BHP et éthanol (Toussaint *et al.*, 1992). Il existe donc des mécanismes permettant la survie des fibroblastes humains en SIPS. L'augmentation du niveau de protéines anti-apoptiques et la diminution du niveau de protéines pro-apoptotiques pourrait faire partie de ces mécanismes.

Une régulation fine, éventuellement croisée, des mécanismes impliqués dans l'apoptose, le métabolisme énergétique, le cycle cellulaire et dans la morphogenèse est aussi envisageable. L'étude des niveaux de transcrits de gènes impliqués dans ces fonctions cellulaires sera un pré-requis avant d'aller plus en avant dans l'étude de ces mécanismes complexes. Ainsi aurons nous une vue plus globale sur les acteurs orchestrant un complexe ballet pendant lequel se décide ou non l'activation du couperet moléculaire réglant la destinée cellulaire.

Bibliographie

VI. Bibliographie

- Allsopp R. C., H. Vaziri *et al.*, *Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 10114-10118, 1992.
- Atadja P. W., K. F. Stringer *et al.*, *Loss of serum response element-binding activity and hyperphosphorylation of serum response factor during cellular aging*, Mol Cell Biol, 14, 4991-9., 1994.
- Bernard D., B. Quatannens *et al.*, *Antiproliferative and antiapoptotic effects of crel may occur within the same cells via the up-regulation of manganese superoxide dismutase*, Cancer Res, 61, 2656-2664., 2001.
- Bodnar A. G., M. Ouellette *et al.*, *Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells*, Science, 279, 349-52, 1998.
- Bustin S. A., *Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays*, J Mol Endocrinol, 25, 169-93, 2000.
- Campisi J., *Replicative senescence: an old lives' tale?*, Cell, 84, 497-500., 1996.
- Carrel A., *On the permanent life of tissues outside the organism*, J. Exp. Med., 15, 516, 1912.
- Chainiaux F., J. P. Magalhaes *et al.*, *UVB-induced premature senescence of human diploid fibroblasts*, The international Journal of Biochemistry & cell biology, soumis.
- Chen J. W., C. Dodia *et al.*, *1-Cys peroxiredoxin, a bifunctional enzyme with glutathione peroxidase and phospholipase A2 activities*, J Biol Chem, 275, 28421-7., 2000a.
- Chen Q. and B. N. Ames, *Senescence-like growth arrest induced by hydrogen peroxide in human diploid fibroblast F65 cells.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 4130-4134, 1994.
- Chen Q. M., J. C. Bartholomew *et al.*, *Molecular analysis of H₂O₂-induced senescent-like growth arrest in normal human fibroblasts: p53 and Rb control G1 arrest but not cell replication*, Biochem J, 332, 43-50., 1998.
- Chen Q. M., K. R. Prowse *et al.*, *Uncoupling the senescent phenotype from telomere shortening in hydrogen peroxide-treated fibroblasts*, Exp Cell Res, 265, 294-303., 2001.
- Chen Q. M., V. C. Tu *et al.*, *Involvement of Rb family proteins, focal adhesion proteins and protein synthesis in senescent morphogenesis induced by hydrogen peroxide*, J Cell Sci, 113, 4087-97., 2000b.
- Chen Z., M. Naito *et al.*, *A human IAP-family gene, apollon, expressed in human brain cancer cells*, Biochem Biophys Res Commun, 264, 847-54., 1999.
- Cheung V. G., M. Morley *et al.*, *Making and reading microarrays*, Nat Genet, 21, 15-9., 1999.
- Cristofalo V. J. and B. B. Sharf, *Cellular senescence and DNA synthesis. Thymidine incorporation as a measure of population age in human diploid cells*, Exp Cell Res, 76, 419-27., 1973.
- Cross S., J. Lindsey *et al.*, *The structure of a subterminal repeated sequence present on many human chromosomes*, Nucleic Acids Res, 18, 6649-57, 1990.
- Dierick J. F., D. Kalume *et al.*, *Identification of 30 protein species involved in replicative senescence and stress-induced premature senescence-like phenotype after proteomic profiling*, soumis pour publication.
- Dimri G. P., X. Lee *et al.*, *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*, Proc Natl Acad Sci U S A, 92, 9363-7., 1995.

- Dintilhac A. and J. Bernues, *HMGB1 interacts with many apparently unrelated proteins by recognizing short amino acid sequences*, J Biol Chem, 277, 7021-8, 2002.
- Dumont P., L. Balbeur *et al.*, *Appearance of biomarkers of in vitro ageing after successive stimulation of WI-38 fibroblasts with IL-1 α and TNF- β : senescence associated β -galactosidase activity and morphotype transition*, J Anat, 197 Pt 4, 529-37., 2000a.
- Dumont P., M. Burton *et al.*, *Induction of replicative senescence biomarkers by sublethal oxidative stresses in normal human fibroblast*, Free Radic Biol Med, 28, 361-73., 2000b.
- Dumont P., F. Chainiaux *et al.*, *Overexpression of apolipoprotein J in human fibroblasts protects against cytotoxicity and premature senescence induced by ethanol and tert-butylhydroperoxide*, Cell Stress Chaperones, 7, 23-35., 2002.
- Dumont P., V. Royer *et al.*, *Growth kinetics rather than stress accelerate telomere shortening in cultures of human diploid fibroblasts in oxidative stress-induced premature senescence*, FEBS Lett, 502, 109-12., 2001.
- Farnham P. J., J. E. Slansky *et al.*, *The role of E2F in the mammalian cell cycle.*, Biochim. Biophys. Acta, 1155, 125-131, 1993.
- Fisher A. B., C. Dodia *et al.*, *Phospholipid hydroperoxides are substrates for non-selenium glutathione peroxidase*, J Biol Chem, 274, 21326-34., 1999.
- Frippiat C., Q. M. Chen *et al.*, *Cell cycle regulation in H(2)O(2)-induced premature senescence of human diploid fibroblasts and regulatory control exerted by the papilloma virus E6 and E7 proteins*, Exp Gerontol, 35, 733-45., 2000.
- Frippiat C., Q. M. Chen *et al.*, *Subcytotoxic H₂O₂ stress triggers a release of transforming growth factor-beta 1, which induces biomarkers of cellular senescence of human diploid fibroblasts*, J Biol Chem, 276, 2531-7., 2001.
- Godfroid E., *Les puces à ADN*, Chimie nouvelle, 18, 31133119, 2000.
- Goldstein S., S. R. Ballantyne *et al.*, *Energy metabolism in cultured human fibroblasts during aging in vitro*, J Cell Physiol, 112, 419-24., 1982.
- Harley C. B., A. B. Futcher *et al.*, *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts*, Nature, 345, 458-460, 1990.
- Hastie D. N., M. Dempster *et al.*, *Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with aging*, Nature, 346, 866-868, 1990.
- Hawkes C. and S. Kar, *Insulin-like growth factor-II/Mannose-6-phosphate receptor in the spinal cord and dorsal root ganglia of the adult rat*, Eur J Neurosci, 15, 33-9., 2002.
- Hayflick L., *The cellular basis for biological aging.*, in "Handbook of the biology of aging.", C. E. Finch, Hayflick, L. (Eds), Von Nostrand R., 159, 1977.
- Hayflick L. and P. S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strain*, Exp. Cell Res., 25, 585-621, 1961.
- Jang W., J. S. Weber *et al.*, *Aup1, a novel gene on mouse chromosome 6 and human chromosome 2p13*, Genomics, 36, 366-8., 1996.
- Kikuno R., T. Nagase *et al.*, *HUGE: a database for human large proteins identified in the Kazusa cDNA sequencing project*, Nucleic Acids Res, 30, 166-8, 2002.
- Kozian D. H. and B. J. Kirschbaum, *Comparative gene-expression analysis*, Tibtech., 17, 73-78, 1999.

- Kurz D. J., S. Decary *et al.*, *Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells*, J Cell Sci, 113 (Pt 20), 3613-22, 2000.
- Lander E. S., *Array of hope*, Nat Genet, 21, 3-4, 1999.
- Laureys G., D. E. Barton *et al.*, *Chromosomal mapping of the gene for the type II insulin-like growth factor receptor/cation-independent mannose 6-phosphate receptor in man and mouse*, Genomics, 3, 224-9., 1988.
- Liang P. and P. A. B., *Differential Display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction*, Science, 257, 967-971, 1992.
- Liang P. and A. B. Pardee, *Recent advances in differential display*, Curr Opin Immunol, 7, 274-80, 1995.
- Linskens M. H., J. Feng *et al.*, *Cataloging altered gene expression in young and senescent cells using enhanced differential display*, Nucleic Acids Res, 23, 3244-51, 1995.
- Meyne J., R. L. Ratliff *et al.*, *Conservation of human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 7049-7053, 1989.
- Morgan D. O., J. C. Edman *et al.*, *Insulin-like growth factor II receptor as a multifunctional binding protein*, Nature, 329, 301-307, 1987.
- Oshima A., C. M. Nolan *et al.*, *The human cation-independent mannose 6-phosphate receptor. Cloning and sequence of the full-length cDNA and expression of functional receptor in COS cells*, J Biol Chem, 263, 2553-62, 1988.
- Pines J., *Arresting developments in cell cycle control.*, TIBS, 19, 760-763, 1994.
- Remacle J. A., A. Houbion *et al.*, *Subcellular fractionation of WI-38 fibroblasts. Comparison between young and old cells*, Biochim Biophys Acta, 630, 57-70., 1980.
- Shay J. W. and W. E. Wright, *Hayflick, his limit, and cellular ageing*, Nat Rev Mol Cell Biol, 1, 72-6., 2000.
- Stros M., T. Ozaki *et al.*, *HMGB1 and HMGB2 cell-specifically down-regulate the p53- and p73- dependent sequence-specific transactivation from the human Bax gene promoter*, J Biol Chem, 277, 7157-64, 2002.
- Toussaint O., P. Dumont *et al.*, *Stress-induced premature senescence. Essence of life, evolution, stress, and aging*, Ann N Y Acad Sci, 908, 85-98., 2000a.
- Toussaint O., P. Dumont *et al.*, *Stress-induced premature senescence or stress-induced senescence-like phenotype : one in vivo reality, two possible definitions ? How stress, cellular behaviors, growth kinetics and cell heterogeneity interact in senescence.*, The Scientific World J., 2, 230-247, 2002a.
- Toussaint O., A. Houbion *et al.*, *Aging as a multi-step process characterized by a lowering of entropy production leading the cell to a sequence of defined stages. II. Testing some predictions on aging human fibroblasts in culture*, Mech Ageing Dev, 65, 65-83., 1992.
- Toussaint O., C. Michiels *et al.*, *Cellular aging and the importance of energetic factors*, Exp. Gerontol., 30, 1-22, 1995.
- Toussaint O., J. Remacle *et al.*, *Stress-induced premature senescence: from biomarkers to likeliness of in vivo occurrence*, Biogerontology, 3, 13-7, 2002b.
- Toussaint O., J. Remacle *et al.*, *From the Hayflick to the mosaics of aging. Role of stress-induced premature senescence in human aging*, Soumis.
- van Kuijk F. J. and E. A. Dratz, *Detection of phospholipid peroxides in biological samples*, Free Radic Biol Med, 3, 349-54, 1987.
- Velculescu V. E., L. Zhang *et al.*, *Serial analysis of gene expression*, Science, 270, 484-7, 1995.

- von Zglinicki T., G. Saretzki *et al.*, *Mild hyperoxia shortens telomeres and inhibits proliferation of fibroblasts : a model for senescence ?*, Exp. Cell Res., 220, 186-193, 1995.
- Wang H., O. Bloom *et al.*, *HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice*, Science, 285, 248-51., 1999.
- Weinberg R. A., *The retinoblastoma protein and cell cycle control.*, Cell, 81, 323-330, 1995.
- Wen L., J. K. Huang *et al.*, *A human placental cDNA clone that encodes nonhistone chromosomal protein HMG-1*, Nucleic Acids Res, 17, 1197-214., 1989.

SECRETARIAT BIOLOGIE
F.U.N.D.P.
Rue de Bruxelles, 59
B 5000 NAMUR (Belgique)
Tél. 081 / 72 44 18 - Fax 081 / 72 44 20

17 JUIN 2002